

(19) 日本特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-507931

(P2001-507931A)

(43) 公表日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

【特許請求の範囲】

1. ディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼからなる群より選択されるリグナン生合成経路から単離されたタンパク質であって、ここで、該単離されたタンパク質がビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼである場合、該単離されたタンパク質が少なくとも5 $\mu$ mol $\cdot$ h $^{-1}$ mg $^{-1}$ の酵素活性を有する、単離されたタンパク質。

2. ディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

3. Forsythia からのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

4. Forsythia intermedia からのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項3に記載の単離されたタンパク質。

5. Tsuga からのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

6. Tsuga heterophylla からのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項5に記載の単離されたタンパク質。

7. Thuja からのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

8. Thuja plicata からのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項7に記載の単離されたタンパク質。

9. 配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、および35からなる群より選択されるディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求1に記載の単離されたタンパク質。

10. ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

11. Forsythia からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項10に記載の単離されたタンパク質。

12. Forsythia intermedia からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクター

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	チーゴド (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA
1/15		1/15	
1/19		1/19	
1/21		1/21	
5/10		9/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全100頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	(71) 出願人	(72) 発明者	(74) 代理人
特願平10-521816	ワシントン ステート ユニバーシティ リサーチ ファウンデーション アメリカ合衆国 ワシントン 98104- 1802, プルマン, イーストゲート プール バード エス. イー. 1615	レウイス, ノーマン ジー. アメリカ合衆国 ワシントン 98103, プ ルマン, エス. イー. アバー ドライブ 1710	弁護士 山本 秀賀
(86) (22) 出願日 平成9年11月7日 (1997.11.7)			
(85) 優先権主張日 平成11年5月10日 (1999.5.10)			
(86) 国際出願番号 PCT/US97/20391			
(87) 国際公開番号 WO98/20113			
(87) 国際公開日 平成10年5月14日 (1998.5.14)			
(31) 優先権主張番号 60/030, 522			
(32) 優先日 平成8年11月8日 (1996.11.8)			
(33) 優先権主張国 米国 (US)			
(31) 優先権主張番号 60/054, 380			
(32) 優先日 平成9年7月31日 (1997.7.31)			
(33) 優先権主張国 米国 (US)			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織スビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ、組織スディリジェントタンパク質、および使用方法

(57) 【要約】  
ディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼは、Forsythia intermedia, Thuja plicata, および Tsuga heterophylla から、これらの種からのディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする cDNA とともに単離されている。従って、ディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発明をコードする、単離された cDNA 配列が提供される。他の局面において、ディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ、または少なくともディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの cDNA もしくは RNA の一部に部分的であり、それらと組み合わせてハイレゾリューションを可能にする塩基配列をコードする、例えは、ポリヌクレオチド配列が提供される。あるいは、ディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする cDNA または RNA は、遺伝子発現のためのプロンプトとして有用である。アンチセンスディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ cDNA、または相補的なディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの cDNA フラグメント)。なお他の局面において、組織スクロニング、ビヒルおよび/またはディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする cDNA 配列で、形質転換され、トランスフェクトされ、感染され、そして/または注入された、改変された宿主細胞が提供される。従って、その後の使用のための有意な量の組織スディリジェントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの産生、単離、および精製を容易にし、リグナン生合成を増強または他の形式で改変するために、組織中のディリジェントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現または増強した発現を得るために使用され得るか、あるいはディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現または発現のために他の形式で利用され得る、ディリジェントタンパク質および/またはビノ

ーゼの生物学的活性を有する、請求項11に記載の単離されたタンパク質。

13. *Tsuga* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項10に記載の単離されたタンパク質。

14. *Tsuga heterophylla* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項13に記載の単離されたタンパク質。

15. *Thuja* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項10に記載の単離されたタンパク質。

16. *Thuja plicata* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項15に記載の単離されたタンパク質。

17. 配列番号48、50、52、54、56、58、62、64、66、68、70、および72からなる群より選択されるピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

18. ディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

19. *Forsythia* 種からのディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

20. *Forsythia intermedia* からのディリジエントタンパク質をコードする、請求項19に記載のヌクレオチド配列。

21. 配列番号13または配列番号15の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

22. 配列番号13または配列番号15のアミノ酸配列をコードする、請求項19に記載の単離されたヌクレオチド配列。

23. 配列番号12または配列番号14の配列を有する、請求項19に記載の単離されたヌクレオチド配列。

24. *Tsuga* 種からのディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

25. *Tsuga heterophylla* からのディリジエントタンパク質をコードする、請求項24に記載のヌクレオチド配列。

26. 配列番号17または配列番号19の生物学的活性を有するタンパク質をコード

する、単離されたヌクレオチド配列。

27. 配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列コードする、請求項24に記載の単離されたヌクレオチド配列。

28. 配列番号16または18の配列を有する、請求項24に記載の単離されたヌクレオチド配列。

29. *Thuja* 種からのディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

30. *Thuja plicata* からのディリジエントタンパク質をコードする、請求項29に記載のヌクレオチド配列。

31. 配列番号21、23、25、27、29、31、33、または35のいずれか1項に記載の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

32. 配列番号21、23、25、27、29、31、33、または35のいずれか1項に記載のアミノ酸配列をコードする、請求項29に記載の単離されたヌクレオチド配列。

33. 配列番号20、22、24、26、28、30、32、または34のいずれか1項に記載の配列を有する、請求項29に記載の単離されたヌクレオチド配列。

34. *Forsythia* 種からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、単離されたヌクレオチド配列。

35. *Forsythia intermedia* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、請求項34に記載のヌクレオチド配列。

36. 配列番号48、50、52、54、56、または58のいずれか1項に記載の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

37. 配列番号48、50、52、54、56、または58のいずれか1項に記載のアミノ酸配列コードする、請求項34に記載の単離されたヌクレオチド配列。

38. 配列番号47、49、51、53、55、または57のいずれか1項に記載の配列を有する、請求項34に記載の単離されたヌクレオチド配列。

39. *Thuja* 種からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、単離されたヌクレオチド配列。

40. *Thuja plicata*からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、請求項39に記載のヌクレオチド配列。

41. 配列番号62、64、66、または68のいずれか1項に記載の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

42. 配列番号62、64、66、または68のいずれか1項に記載のアミノ酸配列をコードする、請求項39に記載の単離されたヌクレオチド配列。

43. 配列番号61、63、65、または67のいずれか1項に記載の配列を有する、請求項39に記載の単離されたヌクレオチド配列。

44. *Tsuga*種からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、単離されたヌクレオチド配列。

45. *Tsuga heterophylla*からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、請求項44に記載のヌクレオチド配列。

46. 配列番号70または配列番号72の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

47. 配列番号70または配列番号72のアミノ酸配列をコードする、請求項44に記載の単離されたヌクレオチド配列。

記載の単離されたヌクレオチド配列。

48. 配列番号69または配列番号71の配列を有する、請求項44に記載の単離されたヌクレオチド配列。

49. 配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、および35からなる群より選択されるアイルジエントタンパク質の生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能発現ベクター。

50. 配列番号48、50、52、54、56、58、62、64、66、68、70、および72からなる群より選択されるビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能発現ベクター。

51. 請求項49に記載のベクターを含む、宿主細胞。

52. 請求項50に記載のベクターを含む、宿主細胞。

53. 適切な宿主細胞においてビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ

の発現を増強する方法であって、該宿主細胞に、配列番号48、50、52、54、56、58、62、64、66、68、70、および72からなる群より選択されるタンパク質の生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

54. 適切な宿主細胞においてビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現を改変する方法であって、該宿主細胞に、配列番号47、49、51、53、55、57、61、63、65、67、69、および71からなる群より選択される核酸分子の全てまたは一部に相補的であるRNAを発現するヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

55. 適切な宿主細胞においてアイルジエントタンパク質の発現を増強する方法であって、該宿主細胞に、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、および35からなる群より選択されるタンパク質の生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

56. 適切な宿主細胞においてアイルジエントタンパク質の発現を改変する方法であって、該宿主細胞に、配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、および34からなる群より選択される核酸分子の全てまたは一部に相補的であるRNAを発現するヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

57. 光学的に純粋なリグナンを産生する方法であって、光学的に純粋なリグナンを産生するために、二分子フェノキシカップリング反応を指向し得るアイルジエントタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを宿主細胞に導入する工程、および該光学的に純粋なリグナンを該宿主細胞から精製する工程を包含する、方法。

58. 前記ヌクレオチド配列が、配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、および34からなる群より選択される、請求項57に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 組換えビノレスシノール／ラリシレシノールレダクターゼ、

## 組換えディリジエントタンパク質、および使用方法

## 発明の分野

本発明は、*Forsythia intermedia*, *Tsuga heterophylla*, および *Thuja plicata* から単離されたディリジエント (difrigent) タンパク質およびビノレスシノール／ラリシレシノールレダクターゼ、*Forsythia intermedia*, *Tsuga heterophylla*, および *Thuja plicata* からのディリジエントタンパク質およびビノレスシノール／ラリシレシノールレダクターゼをコードする核酸配列、ならびにそれらの配列を含むベクター、それらの配列を含む宿主細胞、および組換えビノレスシノール／ラリシレシノールレダクターゼ、組換えディリジエントタンパク質、およびそれらの改変体を生成する方法に関する。

## 発明の背景

リグナンは、広い範囲の生理学的機能および薬理学的に重要な特性を有する、巨大な構造多様性クラスの維管束植物代謝物である (Ayres, D. C., および Lolike, J. D., *Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Lignans, Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, Cambridge, England (1990); Lewis, R., *Chemistry of the Amazon, Biodiversity Natural Products and Environmental Issues*, 588, (P. R. Seidl, O. R. Gottlieb および M. A. C. Kaplan) 135-167, ACS Symposium Series, Washington D. C. (1995)). それらの明白な抗生物質特性 (Markkanen, T. R., *Drugs Exptl. Clin. Res.* 7:711-718 (1981)), 抗酸化剤特性 (Fauré, M. R., *Phytochemistry* 29:3773-3775 (1990); Osa, T. R., *Agric. Biol. Chem.* 49:3351-3352 (1985)), および摂食抑制物質特性 (H. amantha, J., および Nawrot, J., *Biochem. Syst. Ecol.* 12:95-98 (1984)) のために、維管束植物におけるリグナンの主な役割は、種々の日和見性生物学的病原体および捕食動物に対する抵抗性を付与するのを補助することである。リグナンはまた、

サイトカインとして (Birns, A. N. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:980-984 (1987

7)), および木化における中間体として (Rahman, M. M. A. R., *Phytochemistry* 29:1861-1866 (1990)) 提唱されており、これは、植物生長および発生における重要な役割を示唆する。生化学経路のリグニン／リグナンへの同化作用およびフェニルアラニンからの関連基質 (チロシン) は、水生植物のそれらの維管束乾燥地帯対応物への首尾良い変異 (transition) (Lewis, N. G., および Davin, L. B., *Isoprenoids and Other Natural Products, Evolution and Function*, 562 (W. D. Nes, 編) 202-246, ACS Symposium Series: Washington, DC (1994)), 4 億 8000 年前のいくつか (Graham, L. E., *Origin of Land Plants*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1993)) に必須であったことが、幅広く支持される。

存在する化学分類学的データに基づいて、リグナンは、シダ類 *Blechnum orientale* (Wada, H. R., *Chem. Pharm. Bull.* 40:2099-2101 (1992)) および マツモ (例えば、*Dendrocero japonicus* および *Megaceros flagellaris*) (Takeda, R. R., *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy*, 第 29 巻 (Zinsmeister, H. D., および Mures, R. 編) 201-207 頁, Oxford University Press: New York, NY (1990); Takeda, R. R., *Tetrahedron Lett.* 31:4159-4162 (1990)) のような「原始」植物において存在し、シシル紀に発生するとして最近分類されている (Graham, L. E., *J. Plant Res.* 109:241-252 (1996))。興味深いことに、裸子植物および被子植物の両方の進化は、リグナンの構造複雑性および酸化改変における主な変化によって達成された (Lewis, N. G., および Davin, L. B., *Isoprenoids and Other Natural Products, Evolution and Function*, 562 (W. D. Nes, 編) 202-246, ACS Symposium Series: Washington, DC (1994); Gottlieb, O. R., および Yoshida, M., *Natural Products of Woody Plants, Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall* (Rowe, J. W., および Kirk, C. H. 編) 439-511 頁, Springer Verlag: Berlin (1989))。実際は、*Western Red Cedar (Thuja plicata)* のようないくつかの種において、リグナンは心材色、質、芳香、および耐久性を増強することによって、心材形成／作製に広範に寄与し得る。

植物におけるそれらの機能に加えて、リグナンはまた、重要な薬理学的役割を有する。例えば、ボドフィロトキシンは、そのエトポシドおよびテニオシド (te

niposide) 誘導体と同様に、抗ガン剤として首尾よく使用されている植物化合物の例である (Ayres, D.C., および Loike, J.D. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Lignans*, Chemical, Biological and Clinical Properties, Cambridge University Press, Cambridge, England (1990))。抗ウイルス特性はまた、選択されたリグナンについて報告されている。例えば、(-)-アークタイゲニン (arcligenin) (Schröder, H.C.ら, *Z. Naturforsch.* 45c, 1216-1211 (1990))、(-)-トラシエロゲニン (trachelogenin) (Schröder, H.C.ら, *Z. Naturforsch.* 4

5c, 1215-1211 (1990))、およびノルジヒドログアヤレン酸 (nordihydroguaiaretic acid) (Gnabre, J.N.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11239-11243 (1995)) は、それらの明白な逆転写酵素阻害活性に起因して、HIVに対して各々有効である。いくつかのリグナン (例えば、マタイレジノール (matiresinol) (Nikaido, T.ら, *Chem. Pharm. Bull.* 29:3586-3592 (1981)) は、cAMPホスホジエステラーゼを阻害する一方、他は、心血管活性を増強する (例えば、シリンガレジノール (syringaresinol)  $\beta$ -D-グルコシダーゼ) (Nishibe, S.ら, *Chem. Pharm. Bull.* 38:1763-1765 (1990))。また、常食における、高繊維常食の消化後に形成される「哺乳動物」リグナンまたは「フィトエストロゲン」、エンテロラクトン (enterolactone) およびエンテロジオール (enterodiol) の存在と、乳ガンおよび前立腺ガンの減少した発生率との間の高い相関関係が存在する (いわゆる、化学防御) (Avelson, M., および Setchell, K.D.R., *FEBS Lett.* 123:337-342 (1981); Adlercreutzら, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41:3-8 (1992); Adlercreutzら, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52:97-103 (1995))。「哺乳動物リグナン」は、順に、マタイレジノールおよびセコイノラリシレシノール (secoisolaricresinol) のようなリグナンに由来すると考えられる (Borrielloら, *J. Applied Bacteriol.*, 58:37-43 (1985))。

リグナンへの生合成経路は、リグナン生合成経路に関与する酵素または遺伝子の単離の先行技術の報告が存在しないが、現在定義されているところである。Forsythia intermediariaからの粗酵素抽出物に関する放射性標識実験に基づいて、8, 8' 結合リグナン (これは、公知のほとんどの一般的なジリグノール (diliganol) 結合 (Davlin, L.B., および Lewis, N.G., *Rec. Adv. Phytochemistry*, 第26巻 (Staffo

rd, H.A., および Ibrahim, R.K. 編), 325-375頁, Plenum Press, New York, NY (1992)) を示す) への侵入が、2つのアキラルコニフェリルアルコール分子の立体選択的カップリングを介して、酸化化フリーラジカルの形態において生じ、フロフラン (furofuran) リグナン (+)-ビノレシノールを産出することが最初に確認された (Davlin, L.B., Bedgar, D.L., Katayama, T., および Lewis, N.G., *Phytochemistry* 31:3869-3874 (1992); Paré, P.W.ら, *Tetrahedron Lett.* 35:4731-4734 (1994)) (図1)。

二分子フェノキシラジカルカップリング反応 (例えば、フロフランリグナン (+)-ビノレシノールを産出する、2つのアキラルコニフェリルアルコール分子の立体選択的カップリング) には、多数の生物学的プロセスに関与する。これらは、維管束植物におけるリグニン形成 (M.Noseら, *Phytochemistry* 39:71 (1995))、維管束植物におけるリグナン形成 (N.G.Lewis および L.B.Davlin, *ACS Symp. Ser.* 562:202 (1994); P.W.Paréら, *Tetrahedron Lett.* 35:4731 (1994))、維管束植物におけるスベリン形成 (M.A.Bernardsら, *J. Biol. Chem.* 270:7382 (1995))、其菌における子実体発生 (J.D.Bu'Lockら, *J. Chem. Soc.* 2085 (1962))、昆虫クチクラメラニン沈着および硬化 (M.Miessnerら, *Helv. Chim. Acta* 74:1205 (1991); V.J. Marimónら, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31:119 (1996))、アブラムシ色素の形成 (D.W.Cameron および Load Todd, *Organic Substances of Natural Origin. Oxidative Coupling of Phenols*, W.I.Taylor および A.R.Battersby 編 (M.A.Ragan ed., 1967) 第1巻, 203頁)、および藻類細胞壁ポリマーの形成 (M.A.Ragan, *Phytochemistry* 23:2029 (1984)) を含むと推定される。

前述のリグニンおよびリグナン基質のインビボでの生合成において観察される顕著な位置化学 (regiochemical) および/または立体化学特性とは対照的に、全ての以前に記載の化学的インビトロ二分子フェノキシラジカルカップリング反応 (J.Iqbalら, *Chem. Rev.* 94:519 (1994)) および酵素的インビトロ二分子フェノキシラジカルカップリング反応 (K.Freudenberg, *Science* 148:595 (1965)) は、厳密な位置特異的制御および立体特異的制御を欠如している。すなわち、キラル中心が、インビトロでのカップリングの間に導入される場合、産物はラセミ体であり、そして1つより多い潜在的カップリング部位が存在する場合、異な

る

位置化学が生じ得る。従って、特定の鏡像異性形態またはインビトロでの特異的カップリング産物を生じる能力は、明白な制御下ではない。結果的に、二分子フエノキシラジカルカップリング反応の位置化学および立体化学を制御して、例えばリグナンの形成を導くという機構がインビボで存在することが推測される。

Forsythia intermedia、およびおそらく他の種において、(+)-ビノレシノール(2つのE-コニフェリルアルコール分子の立体特異的カップリングの産物)は、逐次還元を受けて、(+)-ラリシレシノール、次いで(-)-セコイソラリシレシノールを生じる(Katayama, T.ら, Phytochemistry 32:581-591(1993); Chu, A.ら, J. Biol. Chem. 268:27026-27033(1993)) (図1)。今までは、1つより多いレダクターゼが、逐次工程を触媒するのに必要とされるか否かは不明であったが、還元は、NADPHのプロR水素化物の抽出を介して進行し、産物 (+)-ラリシレシノールおよび(-)-セコイソラリシレシノールのC-7およびC-7'位置の両方で立体配置の「反転」を生じた(Chu, A.ら, J. Biol. Chem. 268:27026-27033(1993))。(-)-マタイレジオールは、(-)-セコイソラリシレシノールの脱水素化を介して続いて形成され、さらにその代謝はおそらく、Ipomoea cairicaにおける抗ウイルス(-)-トラジエログエンおよびPodophyllum peltatumにおける(-)-ポドフィロトキシンのようなリグナンを産出する。

従って、(+)-ビノレシノールの立体特異的形成、ならびに(+)-ラリシレシノールおよび(-)-セコイソラリシレシノールを生じる続く還元工程は、リグナン代謝における中継点である。なぜなら、それらは、フラノ、ジベンジルブタン、ジベンジルブチロラクトン、およびアリーテルテトラヒドロナフトラリグナンサブクラスへの侵入を示すからである。さらに、リグナンは通常、光学活性であるが、存在する特定の鏡像異性体は、植物種の間で異なり得ることに注意するべきである。例えば、(-)-ビノレシノールは、Xanthoxylum ailanthoidesにおいて生じ(Ishiiら, Yakugaku Zasshi 103:279-292(1983))、そして(-)-ラリシレシノールは、Daphne tanguticaにおいて存在する(Lin-Cenら, Planta Medica, 45:172-176(1982))。特定のリグナンの光学活性は、生物学的活性に関する重要な結果

を有し得る。例えば、(-)-トラジエログエンは、HTV-1のインビトロ複製を阻害し、一方、(+)-鏡像異性体は、あまり有効ではない(Schroderら, Naturforsch

h, 45c:1215-1211(1990))。

#### 発明の要旨

前述に従って、本発明の1つの局面において、78kDディリジエントタンパク質が、8,8'-結合リグナン形成における立体特異性を付与することに関与することが、今や発見された。このタンパク質は、検出可能な触媒活性酸化中心を有さず、そして明らかに、コニフェリルアルコール由来フリーラジカルへの結合および配向のみに供し、これは、次いで、立体選択的なカップリングを受け、(+)-ビノレシノールを形成する。フリーラジカルの形成は、最初の場合には、非特異的オキシダーゼまたは非酵素的電子酸化剤のいずれかの酸化許容量を必要とする。本発明の別の局面において、単一の酵素(ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと称される)は、ビノレシノールからラリシレシノール、次いでセコイソラリシレシノールへの変換を触媒する。従って、本発明の1つの局面は、例えば、Forsythia intermedia, Thuja plicata、およびTsuga heterophyllaからのもののような、単離されたディリジエントタンパク質および単離されたビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼに関する。

本発明の他の局面において、Forsythia intermedia (配列番号12および14)、Thuja plicata (配列番号20、22、24、26、28、30、32、および34)、およびTsuga heterophylla (配列番号16および18)からのディリジエントタンパク質をコードするcDNAは、単離および配列決定されており、そして対応するアミノ酸配列は、推定されている。また、Forsythia intermedia (配列番号47、49、51、53、55、および57)、Thuja plicata (配列番号61、63、65、および67)、およびTsuga heterophylla (配列番号69および71)からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAは、単離および配列決定されており、そして対応するアミノ酸配列は、推定されている。

従って、本発明は、単離されたタンパク質、およびディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現をコードする単離

されたDNA配列に関する。他の局面において、本発明は、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼまたはディリジエントタンパク質をコードする核酸配

列を含む複製可能組換えクロロニンゲビヒクルに関する。本発明はまた、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼDNAまたはRNAの少なくとも一部、またはディリジエントタンパク質DNAまたはRNAの少なくとも一部に十分に相補的な、それらへのハイブリダイゼーションを可能にする塩基配列に関する。前述の相補的塩基配列は、以下を含むがこれらに限定されない：アンチセンスピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼRNA；アンチセンスディリジエントタンパク質RNA；ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼDNAまたはディリジエントタンパク質DNAに相補的なDNAのフラグメント、そしてこれらはそれゆえ、ポリメラーゼ連鎖反応プライマーとして、またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼ遺伝子、ディリジエントタンパク質遺伝子、もしくは関連遺伝子のためのプロンプとして有用である。

本発明のおお別の局面において、本発明の組換えクロロニンゲビヒクルおよび/またはDNA配列で形質転換され、トランススフェクトされ、感染され、そして/または注入された改変された宿主細胞が提供される。従って、本発明は、植物、動物、微生物、および細胞培養物におけるピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼおよびディリジエントタンパク質の組換え発現を提供する。本明細書中に記載される発明概念は、植物、動物、微生物、または細胞培養物における、有意な量の組換えピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼもしくはディリジエントタンパク質、またはそれらの酵素産物の産生、単離、および精製を容易にするために使用され得る。

#### 図面の簡単な説明

本発明の前述の局面および多くの付随する利点は、添付する図面と組み合わせの場合、以下の詳細な説明を参照することによってより理解されるように、より容易に理解されるようになる、ここで：

図1は、Forsythia intermediaにおける、E-コニフェリアルコールの(+)-ピノレシノールへの立体特異的変換を示す。この反応の立体選択性は、ディリジ

エントタンパク質によって制御される。次いで、(+)-ピノレシノールは、(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタクターゼによって、(+)-ラリシレシノールおよび(-)-セコイソラリシレシノールに逆統的に変換される。(+)-ピノレシノール、(+)-ラリシレシノール、および(-)-セコイソラリシレシノールは、それぞれリグナンのプロフラン、フラノ、およびジベンジルブタン系統群の前駆体である。

#### 好ましい実施態様の詳細な説明

本明細書中で用いられるように、用語「アミノ酸 (amino acid)」および「アミノ酸 (amino acids)」は、全ての天然に存在するL- $\alpha$ -アミノ酸またはその残基をいう。アミノ酸は、1文字表記または3文字表記のいずれかによって識別される。

Asp	D	アスパラギン酸	Ile	I	イソロイシン
Thr	T	スレオニン	Leu	L	ロイシン
Ser	S	セリン	Tyr	Y	チロシン
Glu	E	グルタミン酸	Phe	F	フェニルアラニン
Pro	P	プロリン	His	H	ヒスチジン
Gly	G	グリシン	Lys	K	リジン
Ala	A	アラニン	Arg	R	アルギニン
Cys	C	システイン	Trp	W	トリプトファン
Val	V	バリン	Gln	Q	グルタミン
Met	M	メチオニン	Asn	N	アスパラギン

本明細書中で用いられるように、用語「ヌクレオチド」は、DNAまたはRNAのモノマー単位をいい、これは、糖部分 (ペントース)、リン酸、および窒素塩素式塩基を含む。塩基は、グリコシド炭素 (ペントースの1'炭素) を介して糖部分に結合し、そして塩基および糖の組合せは、ヌクレオシドと称される。塩基は、アデニン (「A」)、グアニン (「G」)、シトシン (「C」)、およびチミン (「T」) であるDNAの4つの塩基で、ヌクレオチドを特徴づける。イノシン (「I」) は合成塩基であり、これは、4つの天然に存在する塩基 (A、C、G、

またはT)のいずれかを置換するのに使用され得る。4つのRNA塩基は、A、G、C、およびウラシル(「U」)である。本明細書中に記載されるヌクレオチド配

列は、隣接するペントースの3'炭素と5'炭素との間のホスホジエステル結合によって結合されるヌクレオチドの線状配列を含む。

用語「パーセント同一性」(%I)は、2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列が並行して配列される場合、同じ相対的位置を占有するアミノ酸またはヌクレオチドの割合を意味する。

用語「パーセント類似性」(%S)は、2つの比較タンパク質配列の関連性の程度の統計学的基準である。パーセント類似性は、コンピュータプログラムによって計算され、これは、化学的類似性(例えば、比較されるアミノ酸は、酸性、塩基性、疎水性、芳香族などであるか否か)、および/または塩基対変化の最小数によって測定されるような進化的距離(これは、比較されるアミノ酸の対の1つのメンバをコードするコドンに対する他のメンバをコードするコドンに交換するのに必要とされる)に基づくアミノ酸の各比較対に対する数値を割り当てる。計算は、2つの配列の最良適合アラインメントが全ての可能なアラインメントの反復比較によって経験的に作製された後、行われる。(Henikoff, S. および Henikoff, J. G., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992))。

「オリゴヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合を介して結合したデオキシリボヌクレオチドの短い長さの一本鎖または二本鎖配列をいう。オリゴヌクレオチドは、公知の方法によって化学的に合成され、そして例えば、ポリアクリルアミドゲルで精製される。

用語「ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ」は、2つの還元反応: ビノレシノールのラリシレシノールへの還元、およびラリシレシノールのセコインラリシレシノールへの還元を触媒し得る酵素を意味するように、本明細書中使用される。これらの反応の産物(ラリシレシノールおよびセコインラリシレシノール)は、(+)-または(-)-鏡像異性体のいずれかであり得る。

用語「ディリジエントタンパク質」は、二分子フェノキシラジカルカップリン

グ反応を先導し、それにより反応の産物および/またはそのポリマー誘導体の難立体化学および位置化学を決定し得るタンパク質を意味するように、本明細書中使用される。

用語「改変」、「アミノ酸配列改変」、「改変体」、および「アミノ酸配列改

変体」は、対応する天然のディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと比較して、それらのアミノ酸配列においていくつかの相違を有するディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ分子をいう。通常は、改変体は、対応する天然のディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと少なくとも約70%の相同性を有し、そして好ましくは、対応する天然のディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと少なくとも約80%相同性である。本発明内にあるディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのアミノ酸配列改変体は、特定の位置での置換、欠失、および/または挿入を有する。ディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの配列改変体は、所望の増強または減少された酵素活性、改変された位置化学または立体化学、あるいは改変された基質利用性または産物分布を達成するために使用され得る。

置換ディリジエントタンパク質改変体またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ改変体は、除去された対応する天然のディリジエントタンパク質配列またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ配列における少なくとも1つのアミノ酸残基、および同じ位置でのその位置において挿入された異なるアミノ酸を有するものである。置換は単一であり得、ここで分子中の1つのアミノ酸のみが置換されているか、または複数であり得、ここで同じ分子中の2つ以上のアミノ酸が置換されている。ディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ分子の活性における置換変化は、天然のアミノ酸の側鎖と、電荷および/または構造において有意に異なる側鎖を有するアミノ酸の置換によって得られ得る。この型の置換は、ポリペプチド骨格の構造および/または置換の領域における分子の電荷もしくは疎水性に影響を及ぼすこと



が予測される。

ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の活性における穏和な変化は、天然の分子の側鎖と電荷および/または構造において類似である側鎖を有するアミノ酸の置換によって予測される。この型の置換（保存的置換といわれる）は、ポリペプチド骨格の構造または置換の領域における分子の電荷もしくは疎水性のいずれかを実質的に変更させないと予測される。

挿入ディリジエントタンパク質改変体またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ改変体は、天然のディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子における特定の位置でアミノ酸のすぐ隣に挿入される1つ以上のアミノ酸を有するものである。アミノ酸のすぐ隣は、そのアミノ酸の $\alpha$ カルボキシまたは $\alpha$ アミノ官能基のいずれかに結合されることを意味する。挿入は、1つ以上のアミノ酸であり得る。通常は、挿入は、1つまたは2つの保存的アミノ酸からなる。挿入の部位に隣接するアミノ酸に、電荷および/または構造において類似のアミノ酸は、保存的として定義される。あるいは、本発明は、挿入の部位に隣接するアミノ酸とは実質的に異なる電荷および/または構造を有するアミノ酸の挿入を含む。

欠失改変体は、天然のディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子における1つ以上のアミノ酸が除去されているものである。通常は、欠失改変体は、ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の特定の領域において欠失した1つまたは2つのアミノ酸を有する。

用語「アンチセンス」または「アンチセンスRNA」または「アンチセンス核酸」は、メッセンジャーRNA分子の全てまたは一部に相補的である核酸分子を意味するように、本明細書中で使用される。アンチセンス核酸分子は、代表的には、相補的な発現されるメッセンジャーRNA分子のインピボでの発現を阻害するため使用される。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子に関して使用される場合、以下の実施例8に記載されるアッセイのような酵素活性アッセイにおいて測定されるような、ピノレシノールおよびラリシレシノールを還元して、それぞれラリシレシノールおよびセコイソラリシレシノールを得る、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の能力をいう。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ディリジエントタンパク質に関して使用される場合、二分子フェノキシラジカルカップリング反応を先導して、それにより反応の産物およびそのポリマー誘導体の立体化学および位置化学を決定するディリジエントタンパク質の能力をいう。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼのアミノ酸配列改変体は、所望の改変された生物学的活性を有し得、これは、例えば、改変された反応速度論、基質利用性、産物分布、または位置化学および立体化学のような他の特徴を含む。

用語「コードするDNA配列」、「コードするDNA」、および「コードする核酸」は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列をいう。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、翻訳されたポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。従って、DNA配列は、アミノ酸配列をコードする。

用語「複製可能発現ベクター」および「発現ベクター」は、DNAの小片、通常は二本鎖をいい、これは、外来DNAの小片をそれに挿入されてい得る。宿主において天然には見えないDNAである外来DNAは、異種DNAとして規定される。

ベクターは、外来または異種DNAを適切な宿主細胞に転送するのに使用される。一旦宿主細胞に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAと独立的または同時に複製し得、そしてベクターおよびその挿入した（外来）DNAのいくつかのコピーが複製され得る。さらに、ベクターは、外来DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にする必要なエレメントを含む。従って、外来DNAによってコードされるポリペプチドの多くの分子は、迅速に合成され得る。

は、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子に関して使用される場合、以下の実施例8に記載されるアッセイのような酵素活性アッセイにおいて測定されるような、ピノレシノールおよびラリシレシノールを還元して、それぞれラリシレシノールおよびセコイソラリシレシノールを得る、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の能力をいう。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ディリジエントタンパク質に関して使用される場合、二分子フェノキシラジカルカップリング反応を先導して、それにより反応の産物およびそのポリマー誘導体の立体化学および位置化学を決定するディリジエントタンパク質の能力をいう。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼのアミノ酸配列改変体は、所望の改変された生物学的活性を有し得、これは、例えば、改変された反応速度論、基質利用性、産物分布、または位置化学および立体化学のような他の特徴を含む。

用語「コードするDNA配列」、「コードするDNA」、および「コードする核酸」は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列をいう。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、翻訳されたポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。従って、DNA配列は、アミノ酸配列をコードする。

用語「複製可能発現ベクター」および「発現ベクター」は、DNAの小片、通常は二本鎖をいい、これは、外来DNAの小片をそれに挿入されてい得る。宿主において天然には見えないDNAである外来DNAは、異種DNAとして規定される。

ベクターは、外来または異種DNAを適切な宿主細胞に転送するのに使用される。一旦宿主細胞に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAと独立的または同時に複製し得、そしてベクターおよびその挿入した（外来）DNAのいくつかのコピーが複製され得る。さらに、ベクターは、外来DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にする必要なエレメントを含む。従って、外来DNAによってコードされるポリペプチドの多くの分子は、迅速に合成され得る。

用語「形質転換宿主細胞」、「形質転換された」、および「形質転換」は、DNAの細胞への導入をいう。細胞は「宿主細胞」と称され、そして原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。代表的な原核生物宿主細胞としては、*E. coli*の種々の株が挙げられる。代表的な真核生物宿主細胞としては、植物細胞（例えば、トウモロコシ細胞）、酵母細胞、昆虫細胞、または動物細胞が挙げられる。導入されたDNAは、通常、DNAの挿入断片を含むベクターの形態である。導入されたDNA断片は、宿主細胞と同じ種由来、または宿主細胞とは異なる種由来であり得るか、またはハイブリッドDNA配列（いくつかの外來DNAおよび宿主種に由来するいくつかのDNAを含む）であり得る。

本発明に従って、*Forsythia intermedia*、*Thuja plicata*、および*Tsuga heterophylla*由来のディリジエントタンパク質およびピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAが、以下の様式において、単離され、配列決定され、そして発現された。

*Forsythia intermedia*由来のディリジエントタンパク質をコードするcDNAに関連して、経験的に決定された精製プロトコルが開発されて、*Forsythia*ディリジエントタンパク質が単離された。この手順は、ディリジエントタンパク質の少なくとも6つのアイソフォームを生じた。これらのアイソフォームの各々のアイソ末端のアイミノ酸配列決定は、各アイソフォームの配列が同一であることを示した。これらのアイソフォームの混合物のN末端の配列決定は、28アイミノ酸配列を生じた（配列番号1）。これらアイソフォームの混合物のトリプシン消化は、6つのペプチドフラグメントを生じ、これらは、配列番号2から7の配列決定を可能にするのに十分な量に精製された。

PSINT1（配列番号8）と称されるプライマーは、N末端ペプチド（配列番号1）のアイミノ酸9～15の配列に基づいて合成された。PSIIR（配列番号9）と称されるプライマーは、（配列番号2）に示される内部ペプチド配列のアイミノ酸3～9の配列に基づいて合成された。PSI2R（配列番号10）と称されるプライマーは、（配列番号2）に示される内部ペプチド配列のアイミノ酸13～20の配列に基づいて合成された。PSI7R（配列番号11）と称されるプライマーは、（配列番号3）

に示される内部ペプチド配列のアイミノ酸6～12の配列に基づいて合成された。

*Forsythia*全RNAは、大濃度のポリフェノールを含む木質組織のために特異的に設計された方法から改変されたプロトコルを用いて単離された。ポリA+RNAが単離され、そしてcDNAライブラリーが、標準的な手段を用いて構築された。プライマーPSINT1（配列番号8）およびPSI7R（配列番号11）、PSI2R（配列番号10）、またはPSIIR（配列番号9）のうちの1つを、基質としての*Forsythia* cDNAのアリコートとともに利用する各PCR反応は、それぞれ、約370bp、約155bp、および約125bpの単一のcDNAバンドを生じた。PSINT1（配列番号8）-PSI7R（配列番号11）

反応の約370bp産物は、PCRによって増幅され、そして*Forsythia intermedia* cDNAライブラリーの約600,000PFUをスクリーニングするためのプローブとして利用された。2つの別々のcDNAが同定され、pPSDFI1（配列番号12）およびpSDFI2（配列番号14）と命名された。ディリジエントタンパク質をコードするcDNAインサートは、プラスミドpPSDFI1から切り出され、そしてバキュロウイルス移入ベクターpBlueBac4にクローン化された。得られる構築物を使用して、*Spodoptera frugiperda*を形質転換し、そこから、機能的ディリジエントタンパク質を精製した。

*Thuja plicata*および*Tsuga heterophylla*由来のディリジエントタンパク質のクローニングに関連して、*Forsythia* cDNAが、*Tsuga heterophylla*からの2つのディリジエントタンパク質クローン（配列番号16、18）および*Thuja plicata*からの8つのディリジエントタンパク質cDNAクローン（配列番号20、22、24、26、28、30、32、34）を単離するためのプローブとして使用された。

*Forsythia intermedia*由来の(+)ピノレシノール/(+)ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAに関連して、経験的に決定された精製プロトコル（これは、8クロマトグラフィー工程からなる）が、*Forsythia*(+)-ピノレシノール/(+)ラリシレシノールレダクターゼタンパク質を単離するために開発された。この手順は、(+)ピノレシノール/(+)ラリシレシノールレダクターゼの2つのアイソフォームを生じ、これは両方とも、(+)ピノレシノールおよび(+)ラリシ

レシノールの還元を触媒し得た。これらのアインゾフォーム各々のN-末端の配列決定は、同一の30アミノ酸配列 (配列番号36) を生じた。これらのアインゾフォームの両方の混合物のトリブシン消化は、4つのペプチドフラグメントを生じ、これらは、配列決定を可能にするのに十分な量で精製された (配列番号37~40)。さらに、これらのアインゾフォームの両方の混合物の真化シアン切断は、3つのペプチドフラグメントを生じ、これらは、配列決定を可能にするのに十分な量で精製された (配列番号41~43)。

PLRN5 (配列番号44) と称されるプライマーは、N-末端ペプチドのアミノ酸7~13の配列 (配列番号36) に基づいて合成された。PLRL4R (配列番号45) と称されるプライマーは、配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸2~8の

配列に基づいて合成された。PLRL5R (配列番号46) と称されるプライマーは、配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列に基づいて合成された。配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列 (プライマー-PLRL5R (配列番号46) がそれに基づく) はまた、配列番号41に示される、臭化シアンで作製した内部フラグメントのアミノ酸4~10の配列に対応した。

Forsythia全RNAは、大濃度のポリフェノールを含む木質組織のために特異的に設計された方法から改変されたプロトコルを使用して単離された。ポリA+RNAが単離され、そしてcDNAライブラリーが、標準的な手段を用いて構築された。プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびPLRL4R (配列番号45) またはPLRL5R (配列番号46) のいずれかを、基質としてのForsythia cDNAのアリコートとともに利用するPCR反応は、380bpおよび400bpの2つの増幅されたバンドを生じた。1つの400bp cDNAインサートは、Forsythia cDNAライブラリーをスクリーニングするためにプローブとして利用された。400bpプローブは、配列番号47の塩基22~423に対応した。6つのcDNAクローンが、単離されそして配列決定された (配列番号47、49、51、53、55、57)。これらのクローンは共通のコード領域を有し、多くは、異なる5'非翻訳領域およびそれぞれ異なる地点で終わる3'非翻訳領域を有した。これらのcDNA (配列番号47) のうちの1つは、E.coliにおいてβガラクトシダーゼ融合タンパク質として発現し、これは、天然の植物タンパク質として同じ鏡

像異性体特異的反応を触媒した。

(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼおよびThuja plicata由来の(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼのクロニンゲンに関連して、cDNAを合成し、そしてPCR反応におけるテンプレートとして利用した。ここでプライマーは、3'リンカープライマー (配列番号59) および5'プライマー (CR6-NTと称される) (配列番号60) であった。予測した長さ (1.2kb) の少なくとも2つのバンドが生成し、そしてプラスミドベクターにクローン化された。1つのクロニン (pTr-Tp1と称される) (配列番号61) が完全に配列決定され、そしてE.coliにおいてβガラクトシダーゼ融合タンパク質として発現された。pTr-Tp1は、(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼをコードする。

クロニンpTr-Tp1のcDNAインサートを使用して、T.plicata cDNAライブラリーがスクリーニングされ、そしてさらなる唯一のクロニン (pTr-Tp2と称される) (配列番号63) が同定された。pTr-Tp2はpTr-Tp1に高い相同性を有するが、(-)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼをコードする。クロニンpTr-Tp1のcDNAインサートを使用して、T.plicata cDNAライブラリーがスクリーニングされ、そしてさらなる2つのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼcDNA (配列番号65、67) が同定された。

Tsuga heterophylla由来のピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする2つのcDNA (配列番号69、71) が、Tsuga heterophylla cDNAライブラリーをpTr-Tp1 cDNAインサートでスクリーニングすることによって単離された。

ディリジエントタンパク質、(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼ、および(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAの単離は、これらの機能的酵素のための効率的な発現系の開発を可能にし；リダクション生成の発生的調節を検査するための有用なツールを提供し、そして他のディリジエントタンパク質およびピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの単離を可能にする。ディリジエントタンパク質およびピノレシノ

ール／ラリシレシノールレダクターゼcDNAの単離はまた、リグナン生合成を増強または改変するために、広範な生物の形質転換を可能にする。

本発明のタンパク質および核酸は、二分子フェノキシカップリング反応（例えば、フロフラン、フラノ、およびジベンジルブタンリグナン）の産物の立体化学、位置化学（regiochemistry）、またはその両方を予め決定するのに利用される。限定的でない例として、本発明のタンパク質および核酸は、以下のために利用される：植物種における健康保護リグナン（例えば、ポドフィロトキシン）のレベルを上昇させるかまたはそうでなければ改変する（ここで、植物種は、野菜、穀物、および果実、ならびにこのような遺伝的に改変した植物由来の物質を取り込んだ食品を含むがこれらに限定されない）；植物種を遺伝的に改変して、種々の目的（例えば、ニュートラジェン（nutraceuticals）および栄養補助食品）に有用なリグナンの豊富な天然の供給を提供する；所望の生物学的特性を有する光学的に純粋なリグナン（例えば、抗ウイルス特性を有する（-）-アル

クテゲニン（arctigenin））の豊富な供給を産生するように生存生物を遺伝的に改変する。特に、ディリジェントタンパク質結合部位の特徴付けおよび作用の機構は、立体化学的に制御されたポリマーアセンブリのためのテンプレートとして働く一連（array）のディリジェントタンパク質結合部位からなる合成タンパク質の開発を可能にする。

当該分野で周知のN-末端輸送配列（例えば、von Heijne, G.ら、Eur. J. Biochem 180:535-545(1989)；Stryer, Biochemistry W.H. Freeman and Company, New York, NY, 769頁(1988)を参照のこと）は、種々の細胞または細胞外位置に、ディリジェントタンパク質またはピノレシノール／ラリシレシノールレダクターゼを指向させるのに使用される。

欠失、置換、変異、および／または挿入によって産生される得る、野生型ディリジェントタンパク質クロノンならびにピノレシノール／ラリシレシノールクロノンの配列改変体は、先行技術によって制限される範囲を除いて、本発明の範囲内であることが意図される。ディリジェントタンパク質またはピノレシノール／ラ

リシレシノールレダクターゼアミノ酸配列改変体は、野生型ディリジェントタンパク質または野生型ピノレシノール／ラリシレシノールレダクターゼをコードするDNA配列を、例えば、部位特異的変異誘発と通常呼ばれる技術を用いることにより変異させることによって得られ得る。現在、当該分野において周知である種々のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（例えば、ClontechのTransformer Site-Directed Mutagenesisキットのような2プライマー系）が、この目的のために使用され得る。

この系における標的プラスミドの変性に続いて、2つのプライマーは、プラスミドに同時にアニールされる；これらのプライマーのうちの一方は、所望の部位特異的変異を含み、他方は、プラスミドにおける別の点での変異を含み、制限部位の排除を生じる。次いで、第2鎖合成が行われ、これらの2つの変異を強固に連結させ、そして得られるプラスミドは、E.coliのmutS株に形質転換される。プラスミドDNAは、形質転換細菌から単離され、問題の制限部位で制限され（これにより、非変異プラスミドは線状化される）、次いでE.coliに形質転換される。この系は、サブクロニングまたは一本鎖ファージミドの生成を必要とせずに、

発現プラスミドにおいて直接変異の生成を可能にする。2つの変異の強固な連結および強く非変異プラスミドの線状化は、高い変異効率を生じ、そして最小スクリーニングを可能にする。最初の制限部位プライマーの合成に続いて、この方法は、1変異部位あたり1つの新規なプライマー型のみの使用を必要とする。各位置変異体を別々に調製するよりはむしろ、「設計された縮重」オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、所定の部位で所望の変異の全てを同時に導入するために合成され得る。形質転換体は、変異された領域を通じてプラスミドDNAを配列決定して変異クロノンを同定および選別することによってスクリーニングされ得る。次いで、各変異体DNAは制限され、そしてMutation Detection Enhancementゲル（J.T.Baker）で電気泳動することによって分析されて、配列に他の改変が生じていないことを（未変異誘発コントロールに対するバンドシフト比較によって）確認され得る。

検証した変異体二重鎖は、既にこの型のベクターにクロノン化されていない

合、複製可能発現ベクターにクローン化され得、そして得られる発現ベクター構築物は、変異体タンパク質の高レベルの産生および純くそのタンパク質の精製のため、E.coli (例えば、E.coli BL21(DE3)pLysS株) を形質転換するために使用され得る。FAB-MSマッピングの方法は、変異体発現の正確さを迅速にチェックするために使用され得る。この技術は、全体タンパク質を通じてセグメントを配列決定することを提供し、そして配列の割り当てにおける必要な確信を提供する。この型のマッピング実験において、タンパク質はプロテアーゼで消化される(選択は、改変される特定領域に依存する。なぜなら、このセグメントが重要であり、そして残りのマップは未変異誘発タンパク質のマップと同一であるはずだからである)。切断フラグメントのセットは、微小孔(microbore) HPLC (逆相またはイオン交換、再度、改変される特異的領域に依存する) によって分画され、各々の画分においていくつかのペプチドを提供し、そしてペプチドの分子量は、FAB-MSによって決定される。次いで、質量は、予測配列の消化から予測したペプチドの分子量と比較され、そして配列の正確さが素早く確認される。タンパク質改変へのこの変異誘発アプローチが指向されるので、改変したペプチドの配列決定は、MSが予測と一致する場合、必要ではない。変化した残基を検証することが

必要な場合、CADタンデムMS/MSが使用されて、問題の混合物のペプチドを配列決定し得るか、または標的ペプチドが、改変の位置に依存して、計算エドマン分解またはカルボキシペプチダーゼY消化のために精製される。

特定の部位特異的変異の設計において、非保存的置換(例えば、Cys、HisまたはGluをAlaに)を最初に行い、そして活性が結果的に大きく損なわれるかどうかを決定することが一般的に所望され得る。次いで、変異誘発したタンパク質の特性は、改変した機能の感受性指標としての $K_m$ および $k_{cat}$ の速度パラメーターに対して特別の注意をもって試験され、改変した機能から、結合および/または触媒作用における変化自体は、天然の酵素に対する比較によって推定され得る。残基が、この手段によって、活性減損またはノックアウトによって重要であると実証される場合、保存的置換が行われ得る(例えば、側鎖の長さを改変するためのG1

uをAspに; CysをSerに、またはHisをArgに)。芳香族もまた、アルキル側鎖を置換され得るが、疎水性セグメントについては、改変されるのは主にサイズである。正常な産物分布における変化は、反応シーケンスのどの工程が、変異によって改変されているかを示し得る。

他の部位特異的変異誘発技術もまた、本発明のヌクレオチド配列とともに使用され得る。例えば、DNAの制限エンドヌクレアーゼ消化に続く連結は、Sambrookらの第15.3節に記載されるように、ディリジェントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ欠失改変体を作製するのに使用され得る(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY (1989))。同様のストラテジーは、Sambrookら(前出)の第15.3節に記載されるように、挿入改変体を構築するのに使用され得る。

オリゴヌクレオチド特異的変異誘発もまた、本発明の置換改変体を調製するのに使用され得る。本発明の欠失および挿入改変体を簡単に調製するためにもまた使用され得る。この技術は、Adelmanら(DNA 2:183(1983))によって記載されるように、当該分野で周知である。一般的には、少なくとも25ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが、ディリジェントタンパク質遺伝子またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ遺伝子において2つ以上のヌクレオチドを挿入、

欠失、または置換するために使用される。至適オリゴヌクレオチドは、変異をコードするヌクレオチドのどちらの側でも12~15の完全に一致したヌクレオチドを有する。野生型ディリジェントタンパク質または野生型ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを変異誘発するために、オリゴヌクレオチドは、適切なハイブリダイゼーション条件下で、一本鎖DNAテンプレート分子にアニールされる。次いで、DNA重合化酵素(通常は、E.coli DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント)が添加される。この酵素は、DNAの変異保有鎖の合成を完了するためプライマーとして、オリゴヌクレオチドを使用する。従って、ヘテロ二重鎖分子が形成され、その結果、DNAの1つの鎖は、ベクターに挿入された野生型ディリジェントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードし、そしてDNAの第2の鎖は、同じベクターに挿入されたディリジェント

タンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの変異形態をコードする。次いで、このヘテロ二重鎖分子は、適切な宿主細胞に形質転換される。

置換された1より多いアミノ酸を有する変異体は、いくつかの方法のうちの1つにおいて作製される。アミノ酸がポリペプチド鎖においてともに近接して位置する場合、それらは、所望のアミノ酸置換の全てをコードする1つのオリゴヌクレオチドを用いて、同時に変異される。しかし、アミノ酸が、互いにいくらか離れて位置する場合（例えば、10アミノ酸以上によって隔てられる）、所望の変化の全てをコードする単一のオリゴヌクレオチドを作製するのはより困難である。代わりに、2つの別の方法のうち1つが使用される。第1の方法においては、別々のオリゴヌクレオチドが、置換される各アミノ酸のために作製される。次いで、オリゴヌクレオチドは、一本鎖テンプレートDNAに同時にアニールされ、そしてテンプレートから合成されるDNAの第2鎖は、所望のアミノ酸置換の全てをコードする。

別の方法は、所望の変異体を生産するための2回以上の変異誘発を包含する。1回目は、単一の変異体について記載されるとおりである：野生型ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼDNAは、テンプレートのために使用され、第1の所望のアミノ酸置換をコードするオリゴヌ

クレオチドが、このテンプレートにアニールされ、そして次いで、ヘテロ二重鎖DNA分子が作製される。2回目の変異誘発は、1回目の変異誘発において産生した変異DNAをテンプレートとして利用する。従って、このテンプレートは既に、1つ以上の変異を含む。次いで、さらなる所望のアミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドが、このテンプレートにアニールされ、そしてDNAの得られる鎖は今や、一回目および2回目の変異誘発の両方からの変異をコードする。この得られたDNAは、3回目の変異誘発において、テンプレートとして使用され、この後同様に複製される。

真核生物発現系は、ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ生産のために利用される。なぜなら、それらは、任意

の必要な翻訳後改変を行い得、そして適切な膜位置に酵素を指向させ得るからである。この目的のための代表的な真核生物発現系は、組換えバキュロウイルスAutographa californica核多核体ウイルス (AcNPV; M.D. SummersおよびG.E. Smith, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures (1986); Luckowら, Bio-technology 6:47-55 (1987)) を、本発明のディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現のために使用する。昆虫細胞（例えば、Spodoptera frugiperda種の細胞）の組換えバキュロウイルスによる感染は、大量のディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼタンパク質の産生を可能にする。さらに、バキュロウイルス系は、組換えディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの産生についての他の重要な利点を有する。例えば、バキュロウイルスはヒトに感染せず、そしてそれゆえ、大量に安全に扱われ得る。バキュロウイルス系において、ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするDNAセグメントおよびベクターを包含するDNA構築物が調製される。ベクターは、バキュロウイルスの多核体遺伝子プロモーター領域、組換えの間の適切な交差に必要なバキュロウイルス隣接配列（この隣接配列は、プロモーター配列に隣接する約200〜300塩基対を含む）、および構築物が細菌において複製することを可能にする細菌の複製起点を含み得る。ベクターが構築され、その結果、(i) DNAセグメン

トが、多核体遺伝子プロモーターに隣接して（または、これに作動可能に連結して、またはこれの「下流」または「制御下に」）配置され、そして (ii) プロモーター/ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ、またはプロモーター/ディリジエンタンパク質の組合せの両側に、バキュロウイルスDNAの200〜300塩基対（隣接配列）が隣接する。

ディリジエンタンパク質DNA構築物、またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼDNA構築物を産生するために、全量ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAクローンは、本明細書中に記載されるような方法を用いて得られる。DNA構築物は、宿

主細胞において、適切なバキュロウイルス（すなわち、構築物においてコードされるプロモーターと同じ種のバキュロウイルス）のバキュロウイルスDNAと、組換えが成立する条件下で接触される。得られる組換えバキュロウイルスは、完全なディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクタターゼをコードする。例えば、昆虫宿主細胞は、DNA構築物および機能的バキュロウイルスで、同時トランスフェクトされ得るかまたは別々にトランスフェクトされ得る。次いで、得られる組換えバキュロウイルスが単離され、そして細胞に感染させて、ディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクタターゼの産生をもたらすために使用され得る。宿主昆虫細胞としては、例えば、Spodoptera frugiperda細胞が挙げられる。次いで、本発明の組換えバキュロウイルスに感染した昆虫宿主細胞は、バキュロウイルスにコードされるディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクタターゼの発現を可能にする条件下で培養される。従って、産生される組換えタンパク質は、次いで、当該分野で公知の方法を用いて細胞から抽出される。

酵母のような他の真核微生物もまた、本発明を実施するために使用され得る。いくつかの他の株が利用可能であるが、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、一般的に使用される酵母である。プラスミド YRp7 (Strincombら, Nature 282:39(1979); Kingsmanら, Gene 7:141(1979); Tschemperら, Gene 10:157(1980)) は、*Saccharomyces* における発現ベクターとして、一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファンにおいて増殖する能力を欠く酵母の変異体株（例えば、ATCC番号 44,076 および YEP4-1 (Jones, Genetics 85:12(1977))）についての選択マーカーを提供する *trp1* 遺伝子を含む。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての *trp1* 損傷の存在は、トリプトファンの非存在下において増殖することにより形質転換を検出するための有効な環境を提供する。酵母宿主細胞は一般的に、Hinnen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1292(1978)) に記載のように、ポリエチレングリコール法を用いて形質転換される。さらなる酵母形質転換プロトコルは、Gietzら, N.A.R. 20(17):1425(1992); Reevesら, FEMS 99:193-197(1992) に示される。

酵母ベクターにおける適切なプロモーター配列は、3-ホスホグリセレートキナーゼ (Hitzemanら, J. Biol. Chem. 255:2073(1980)) または他の解糖酵素 (Hessら, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149(1968); Hollandら, Biochemistry 17:4900(1978)) (例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ) についてのプロモーターを含む。適切な発現プラスミドの構築において、これらの遺伝子に関連する終結配列もまた、発現されることが所望される配列の3'側で発現ベクターに連結されて、mRNAのポリアダニル化および終結を提供する。増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシクロヘムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、および前述のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域である。酵母適合性プロモーター、複製起点、および終結配列を含む任意のプラスミドベクターが適切である。

多細胞生物（例えば、植物）に由来する細胞培養物は、本発明を実施するための宿主として使用され得る。トランスジェニック植物は、例えば、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクタターゼおよび/またはディリジェントタンパク質をコードするプラスミド、ならびに選択マーカー遺伝子（例えば、カナマイシン耐性をコードする *kan* 遺伝子）を、Hoeckemaら, Nature 303:179-181(1983)に記載

されるように、ヘルパーTiプラスミドを含む *Agrobacterium tumefaciens* に移入し、そして Anら, Plant Physiology 81:301-305(1986)に記載されるように、*Agrobacterium* 細胞を形質転換される植物の葉スライスとともに培養することによって得られ得る。培養した植物宿主細胞の形質転換は、通常、上記のように、*Agrobacterium tumefaciens* を介して達成される。哺乳動物宿主細胞および固い細胞膜バリアを有さない他の宿主細胞の培養は、通常、Grahamおよび Van der Eb (Virology 52:546(1978)) によって元々記載され、そして Sambrookら (前出) の第1

6.32~16.37節に記載されるように改変されたリン酸カルシウム法を用いて形質転換される。しかし、DNAを細胞に導入するための他の方法もまた使用され得る：例えば、ポリプレックス (KawaiおよびNishizawa, Mol. Cell. Biol. 4:1172(1984))、プロトプラスチ融合 (Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163(1980))、エレクトロポレーション (Neumannら, BBIO J. 1:841(1982))、および核への直接マイクロインジェクション (Capechi, Cell 22:479(1980))。さらに、動物形質転換ストラテジーは、Monastersky G.M.およびRobl, J.M., *Strategies in Transgenic Animal Science*, ASM Press, Washington, D.C. (1995)に概説される。形質転換植物カルスは、選択マーカーを介して、例えば、カナマイシンおよび適切な量の植物ホルモン (例えば、カルスおよびシュート誘導のためナフタレン酢酸およびベンジルアデニン) を含む培地で細胞を増殖させることによって選択される。次いで、植物細胞が再生され得、そして得られる植物は、当業者に周知の技術を用いて土壌に移される。

さらに、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ産生またはディリジエントタンパク質産生を調節する遺伝子は、誘導可能な必要プロモーターとともに植物に取り込まれ得る。本発明のこの実施態様の実施において、特定の外部または内部刺激のみに応答するプロモーターが、標的cDNAに融合される。従って、遺伝子は、特定の刺激に応答する以外には、転写されない。遺伝子が転写されない限りは、その遺伝子産物は産生されない。

本発明の実施において使用され得る応答性プロモーター系の例示的な例は、トウモロコシにおけるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 系である。GSTは、発生前除草剤としてしばしば使用される多数の疎水性求電子化合物を解毒し

得る酵素のファミリーである (Weigandら, *Plant Molecular Biology* 7:235-243 (1986))。研究は、GSTが、この増強された除草剤耐性を生じることに関与することを示している。この作用は、主に、特定の1.1kb mRNA転写産物を通して媒介される。要約すれば、トウモロコシは、外部刺激に応答し得、そして遺伝子産物を産生するように誘導され得る、既に存在する天然に存在する静止遺伝子有する。この遺伝子は、以前に同定およびクローニングされている。従って、本

発明の1つの実施態様において、プロモーターは、GST応答遺伝子から取り出され、そして前もってその天然のプロモーターが除去されている、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ遺伝子、またはディリジエントタンパク質遺伝子に付着される。この操作された遺伝子は、外部化学刺激に応答するプロモーターと、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼまたはディリジエントタンパク質の首尾良い産生を担う遺伝子との組合せである。

上記の方法に加えて、クローン化DNAを広範な種々の植物種 (裸子植物、被子植物、単子葉植物、および双子葉植物を含む) に移入するためのいくつかの方法が、当該分野で公知である (例えば、GlickおよびThompson編, *Methods in Plant Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1993)を参照のこと)。例示的な例としては、プロトプラスチによるエレクトロポレーション促進性DNA取り込み (Rhodesら, *Science* 240(4849):204-207(1988))、プロトプラスチのポリエチレングリコールでの処理 (Lyznickら, *Plant Molecular Biology* 13:151-161(1989))、および細胞のDNA荷重 (laden) 微粒子銃 (Kleinら, *Plant Physiology* 91:440-444(1989)およびBoyntonら, *Science* 240(4858):1534-1538(1988))

の照射が挙げられる。多数の方法が、例えば、禾穀類の形質転換について現在存在する (例えば、McKinnon, G.E.およびHenry, R.J., *J. Cereal Science*, 22(3):203-210(1995)、Mendel, R.R.およびTeeri, T.H., *Plant and Microbial Biotechnology Research Series*, 3:81-98, Cambridge University Press (1995)、McElroy, D.およびBrettell, R.I.S., *Trends in Biotechnology*, 12(2):62-68(1994)、Christouら, *Trends in Biotechnology*, 10(7):239-246(1992)、Christou, P.およびFord, T.L., *Annals of Botany*, 75(5):449-454(1995)、Parkら, *Plant Molecular Biology*, 32(6):1135-1148(1996)、Altpeiterら, *Plant Cell Reports*, 1

6:12-17(1996)を参照のこと)。さらに、植物形質転換ストラテジーおよび技術は、Birch, R.G., *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 48:297(1997)、Foresterら, *Exp. Agric.*, 33:15-33(1997)に概説される。わずかな改変により、これらの技術が広範な植物種に適用可能である。

これらの技術の各々は、利点と欠点を有する。各々の技術において、プラスミ



ドからのDNAは、目的の遺伝子のみでなく、選択可能マーカー遺伝子およびスクリーニング可能マーカー遺伝子をも含むように遺伝子操作される。選択可能マーカー遺伝子は、プラスミドのコピーを取り込んでこれらの細胞のみを選択するのに使用される（目的の遺伝子および選択可能遺伝子およびスクリーニング可能遺伝子が、一単位として移入されるように構築される）。スクリーニング可能な遺伝子は、目的の遺伝子を有するこれらの細胞のみの首尾良い培養のための別の遺伝子を、一般的に使用される選択可能マーカー遺伝子は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII (NPT II) である。この遺伝子は、カナマイシン（細胞が増殖する増殖培地に、直接添加され得る化合物）に対する耐性を伝達する。植物細胞は、通常、カナマイシンに感受性であり、そして結果として死亡する。NPT II遺伝子の存在は、カナマイシンの影響を克服し、そしてこの遺伝子を有する各々の細胞は、生存したままである。本発明の実施において使用される、別の選択可能マーカー遺伝子は、除草剤グルフォシネート (glufosinate) (Basta) への耐性を付与する遺伝子である。一般的に使用されるスクリーニング可能な遺伝子は、 $\beta$ グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) である。この遺伝子の存在は、組織化学反応（推定的に形質転換される細胞のサンプルが、GUSアッセイ溶液で処理される）を用いて特徴づけられる。適切なインキュベーションの後、GUS遺伝子を含む細胞は青色に変わる。好ましくは、プラスミドは、選択可能マーカー遺伝子およびスクリーニング可能マーカー遺伝子の両方を含む。

これらの遺伝子の1つ以上を含むプラスミドは、植物プロトプラストまたはカルス細胞のいずれかに、以前に言及した技術のいずれかによって導入される。マーカー遺伝子が選択可能な遺伝子である場合、DNAパッケージを取り込んでいるこれらの細胞のみが、適切な植物毒素試験での選択下で生存可能である。一旦、適切な細胞が同定されそして繁殖されると、植物は再生される。形質転換植物の子孫は、DNAパッケージが植物ゲノムに首尾良く取り込まれていることを保証するために、試験されなければならない。

哺乳動物宿主細胞もまた、本発明の実施において使用され得る。適切な哺乳動物細胞株の例としては、以下が挙げられる：SV40によって形質転換されたサル腎

臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; ヒト胎児性腎臓株293S (Grahamら, J.Gen.Viol. 36:59(1977)) ; ペビーハムスター腎臓細胞 (8HK, ATCC CCL 10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 (UrlabおよびChasin, Proc.Natl.Acad.Sci USA 77:4216(1980)) ; マウスsestoli細胞 (TM4, Mather, Biol.Reprod. 23:243(1980)) ; サル腎臓細胞 (CVL-76, ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト子宮頸ガン細胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; コーニング腎臓細胞 (MOC, ATCC CCL 34) ; パッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; ヒト肺細胞 (WL38, ATCC CCL 75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2, HB8065) ; マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51) ; ラット肝臓ガン細胞 (HTC, MT-54, Baumanら, J.Cell Biol. 85:1(1980)) ; ならびにTRJ細胞 (Matherら, Amal's N.Y.Acad. Sci. 383:44(1982))。これらの細胞についての発現ベクターは、本来（必要であれば）、複製起点、発現される遺伝子の前に位置するプロモーター、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結部位のDNA配列を含む。

哺乳動物発現ベクターに使用されるプロモーターは、しばしば、ウイルス起源である。これらのウイルスプロモーターは、一般的には、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、および最も頻繁には、サルウイルス40 (SV40) に由来する。SV40ウイルスは、初期および後期プロモーターと称される2つのプロモーターを含む。これらのプロモーターは特に有用である。なぜなら、それらは両方、ウイルス複製起点も含む1つのDNAフラグメントとして、ウイルスから容易に得られるからである (Fiersら, Nature 273:113(1978))。より小さなまたはより大きなSV40 DNAフラグメントもまた使用され得る。ただし、これらのフラグメントは、ウイルス複製起点に位置するBgII部位に向かうHindIII部位から伸張される約250bp配列を含む。

あるいは、外来遺伝子と天然に会合するプロモーター（同種プロモーター）が使用され得る。ただし、これらのフラグメントは、形質転換のために選択される宿主細胞株と適合可能である。

複製起点は、外因性供給源（例えば、SV40または他のウイルス（例えば、ポリ

オーマ、アデノ、VSV、BPV) から得られ得、そしてクロロニンゲンベクターに挿入され得る。あるいは、複製起点は、宿主細胞染色体複製機構によって提供される。外来遺伝子を含むベクターが、宿主細胞染色体に取り込まれる場合、後者はしばしば重要である。

二次DNAコード配列の使用は、形質転換細胞株におけるビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼまたはディリジエントタンパク質の産生レベルを増強し得る。二次コード配列は、代表的には、酢酸ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) を含む。DHFRの野生型形態は、通常、化学メトトレキセート (MTX) によって阻害される。細胞におけるDHFR発現のレベルは、培養宿主細胞に添加されるMTXの量に依存して変化する。二次配列として特に有用にするDHFRのさらなる特徴は、形質転換細胞を同定するための選択マーカーとして使用され得ることである。DHFRの2つの形態は、二次配列、野生型DHFR、およびMTX耐性DHFRとしての使用に利用可能である。特定の宿主細胞に使用されるDHFRの型は、宿主細胞がDHFR欠損であるかどうかにかかわらず (その結果、内因的に非常に低いレベルのDHFRを産生するか、または全く機能的DHFRを産生しないかのいずれかである)。Ur1aibおよびCrasin (前出) によって記載されるCHO細胞株のようなDHFR欠損細胞株、野生型DHFRコード配列で形質転換される。形質転換後、これらのDHFR欠損細胞株は、機能的DHFRを発現し、そして栄養性ヒポキサンチン、グリシン、およびチミンを欠如する培養培地において増殖し得る。非形質転換細胞は、この培地において生存しない。

DHFRのMTX耐性形態は、MTX感受性である正常な量の機能的DHFRを内因的に産生するこれらの宿主細胞において形質転換宿主細胞についての選択手段として使用され得る。CHO-K1細胞株 (ATCC番号D61) は、これらの特徴を所有し、従って、この目的のための有用な細胞株である。MTXの細胞培養培地への添加は、MTX耐性DHFRをコードするDNAで形質転換したこれらの細胞のみを、増殖することを可能にする。非形質転換細胞は、この培地において生存し得ない。

原核生物もまた、本発明の最初のクロロニンゲン工程のための宿主細胞として使用され得る。それらは、大量のDNAの迅速な産生のため、部位特異的変異誘発の

ために使用される一本鎖DNAテンプレート の産生のため、同時に多くの変異体をスクリーニングするため、および生成した変異体のDNA配列決定のために特に有用である。適切な原核生物宿主細胞としては、E.coli K12株294 (ATCC番号31,446)、E.coli株W3110 (ATCC番号27,325)、E.coli XL776 (ATCC番号31,537)、およびE.coli Bが挙げられる；しかし、E.coliの多くの他の株 (例えば、HB101、JM101、NM522、NM538、NM539)、ならびに桿菌 (例えば、Bacillus subtilis) 他の腸内細菌科 (例えば、Salmonella typhimuriumまたはSerratia marcescens)、および種々のPseudomonas種を含む原核生物の多くの他の種および属は全て、宿主として使用され得る。原核生物宿主細胞または強固な細胞壁を有する他の宿主細胞は、好ましくは、Sambrookら (前出) のセクション1.82に記載されるような塩化カルシウム法を用いて形質転換のために使用され得る。原核生物形質転換技術は、Dover, W.J., in Genetic Engineering, Principles and Methods, 12:275-296, Plenum Publishing Corp. (1990); Hanahanら, Meth. Enzymol., 204:63 (1991) に示される。

代表的な例として、ディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNA配列は、異種宿主としてのE.coliにおける過剰発現のために、市販の (Novagenから) (His)<sub>6</sub>-Tag pETベクターに移入され得る。このpET発現プラスミドは、高レベルの異種発現系におけるいくつかの利点を有する。所望のcDNAインサートは、インフレームで、6ヒスチジンをコードするプラスミドベクター配列に連結され、続いて標的タンパク質のアミノ末端コドンに結合される高度に特異的なプロテアーゼ認識部位 (トロンピン) に連結される。発現される融合タンパク質のヒスチジン「ブロック」は、固定化金属イオンへの非常に強固な結合を促進し、そして固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィーによる組換えタンパク質の迅速な精製を可能にする。次いで、ヒスチジンリーダー配列は、特異的なタンパク質分解部位で、精製タンパク質のトロンピンでの処理によって切断され、そしてディリジエントタンパク質または

ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼが溶出される。この過剰発現-

複製系は、高能力で優れた分解能を有し、迅速であり、そして（トロンピンタンパク質分解の前および後に）同様の結合挙動を示すE.coliタンパク質が複雑する機会を極めて小さくする。

当業者に明らかなように、宿主細胞に適合する種に由来するレプリコンおよび制御配列を含む任意のプラスミドベクターもまた、本発明の実施において使用され得る。ベクターは通常、複製部位、形質転換細胞における表現型選択を提供するマーカー遺伝子、1つ以上のプロモーター、および外来DNAの挿入のためのいくつかの認識部位を含むポリリンカー領域を有する。E.coliの形質転換のために代表的に使用されるプラスミドとしては、pBR322、pUC18、pUC19、pUC18、pUC19、およびBluescript ML3が挙げられ、これらは全て、Sambrookら（前出）の第19、および1.20章に記載される。しかし、多くの他の適切なベクターも同様に利用可能である。これらのベクターは、アンピシリンおよび/またはテトラサイクリン耐性をコードする遺伝子を含み、これは、これらのベクターで形質転換した細胞が、これらの抗生物質の存在下で増殖することを可能にする。

原核生物ベクターに最も一般的に使用されるプロモーターは、 $\beta$ ラクタマーゼ（ベニシリナーゼ）およびラクトースプロモーター系（Changら、Nature 375:615（1978）；Itakuraら、Science 198:1056（1977）；Godde1ら、Nature 281:544（1979））ならびにトリプトファン（trp）プロモーター系（Goedde1ら、Nuc1.Acids.Res. 8:4057（1980）；EPO Appl.Pub1.No.36,776）、ならびにアルカリホスファターゼ系を含む。これらは最も一般的に使用されるが、他の微生物プロモーターが利用されており、そしてそれらのヌクレオチド配列を確認する詳細は刊行されており、当業者が、プラスミドベクターにそれらを機能的に連結することを可能にする（Siebenlistら、Cell 20:289（1980）を参照のこと）。

細胞から通常分泌される多くの真核生物タンパク質は、アミノ酸配列の一部として、内因性分泌シグナル配列を含む。従って、細胞質に通常見いだされるタンパク質は、シグナル配列をタンパク質に連結することによって分泌のために標的化され得る。これは、シグナル配列をコードするDNAを、タンパク質をコードするDNAの5'末端に連結し、次いでこの融合タンパク質を適切な宿主細胞において

発現することによって容易に達成される。シグナル配列をコードするDNAは、シグナル配列を有するタンパク質をコードする任意の遺伝子からの制限フラグメントとして得られ得る。従って、原核生物、酵母、および真核生物シグナル配列は、本発明を実施するのに利用される宿主細胞の型に依存して、本明細書中使用され得る。いくつかの真核生物遺伝子のシグナル配列部分（例えば、ヒト成長ホルモン、プロインシュリン、およびプロアルブミンを含む）をコードするDNAおよびアミノ酸配列は公知であり（Stryer, Biochemistry W.H.Freeman and Company, New York, NY, 769頁（1988）を参照のこと）、そして適切な真核生物宿主細胞におけるシグナル配列として使用され得る。例えば、酸ホスファターゼ（Arimaら、Nucleic Acids Res. 11:1657（1983））、 $\alpha$ 因子、アルカリホスファターゼ、およびインペルターゼのような酵母シグナル配列は、酵母宿主細胞からの分泌を指向するために使用され得る。例えば、Lam8もしくはOmpF（Wongら、Gene 68:193（1988））、MalE、ProA、または $\beta$ ラクタマーゼをコードする遺伝子ならびに他の遺伝子からの原核生物シグナル配列は、原核生物細胞からのタンパク質を培養培地に標的するために使用され得る。

植物、動物、および微生物からの輸送配列は、本発明の実施において、遺伝子産物を、細胞質、小胞体、ミトコンドリア、もしくは他の細胞成分に指向するため、または培地への搬出のためにタンパク質を標的するために使用され得る。これらの考察は、ピノレシノール/ラリレシノールレダクターゼまたはディリジエントタンパク質の過剰発現、および任意の所望の位置における遺伝子産物の機能を実行するための細胞またはインタクトな生物内での発現の指向に適用される。

目的の複製配列、調節配列、表現型選択遺伝子をコードするDNA、およびディリジエントタンパク質DNAまたはピノレシノール/ラリレシノールレダクターゼDNAを含む適切なベクターの構築物は、標準的な組換えDNA手順を用いて調製される。単離されたプラスミドおよびDNAフラグメントは、当該分野で周知のように（例えば、Sambrookら（前出）を参照のこと）、切断され、仕立てられ、そして所望のベクターを作製するために特定の順序で一緒に連結される。

上記で議論したように、ピノレシノール/ラリレシノールレダクターゼ改変

体またはディリジエントタンパク質改変体は、好ましくは、部位特異的変異誘発の方法を用いて作製される変異（単数または複数）によって産生される。この方法は、オリゴヌクレオチドがDNAテンプレートに安定にハイブリダイズすること、を可能にするために、所望の変異の配列および十分な数の隣接ヌクレオチドの両方をコードする特定のオリゴヌクレオチドの合成および使用が必要である。

ディリジエントタンパク質遺伝子および/またはビノレシノール/ラリシレンノールレダクターゼ遺伝子、あるいはディリジエントタンパク質遺伝子またはビノレシノール/ラリシレンノールレダクターゼ遺伝子の全てまたは一部に相補的なアンチセンス核酸フラグメントは、適切な場合には、種々の目的のための任意の植物種に導入され得、この目的には以下が含まれるがこれらに限定されない：木組織（特に心材組織）の色、手触り、耐久性、および害虫耐性を改変または改善すること；トウモロコシ（これは、動物飼料として有用である）のような植物種におけるリグナンおよび/またはリグニンの形成を低減し、それにより植物材料を採取する動物の消化系への植物材料のセルロース画分の利用可能性を増強すること；バルブおよび紙産生において利用される食物種のリグナン/リグニン含有量を低減し、それにより、より容易および安価にバルブおよび紙を産生すること；捕食動物および病原体に対する植物の防御能力を、防御的リグナンまたはリグニンの産生を増強することによって改善すること；リグナンまたはリグニンによって媒介される他の生態学的相互作用の改変；医薬または植物添加剤として、上昇したレベルの光学的に純粋なリグナン鏡像異性体を産生すること；ディリジエントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレンノールレダクターゼの産生、あるいはビノレシノールまたはラリシレンノールおよびそれらの誘導体の産生を誘導するか、増強すること。ディリジエントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレンノールレダクターゼ遺伝子は、種々の目的のために任意の生物に導入され得、この目的は以下を含むがこれらに限定されない：ディリジエントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレンノールレダクターゼの産生、あるいはビノレシノールまたはラリシレンノールおよびそれらの誘導体の産生を誘導するか、増強するか、または阻害すること。

前述は、以下の例示的な実施例と組み合わせるより完全に理解され得、ここで「プラスミド」は、英小文字p、続く英数字によって示される。本発明において使用される開始プラスミドは、市販されるか、無制限の基準に基づいて公に入手可能であるか、または公開された手順を用いてこのような入手可能なプラスミドから構築され得る。さらに、他の等価なプラスミドは当該分野で公知であり、そして当業者には明らかである。

DNAの「消化」、「切断」、または「切断」は、DNAにおける特定の位置でのみ作用する酵素で、DNAの触媒切断をいう。これらの酵素は、制限エンドヌクレアーゼと称され、そして各酵素が切断するDNA配列に沿った部位は、制限部位と称される。本発明において使用される制限酵素は市販され、そして製造業者によって提供される説明書に従って使用される。（Sambrookら（前述）の第1.60-1.61章および第3.38-3.39章もまた参照のこと）

制限消化物からのDNAの所定のフラグメントの「回収」または「単離」は、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル上での得られたDNAフラグメントの電気泳動による分離、その移動度対公知の分子量のマーカーDNAフラグメントの比較による目的のフラグメントの同定、所望のフラグメントを含むゲル区画の除去、およびゲルのDNAからの分離を意味する。この手順は一般的に公知である。例えば、Lawlis (Nucleic Acids Res. 9:6103-6114(1982))、およびGoeddelら(Nucleic Acids Res., (前出))を参照のこと。

以下の実施例は、本発明を実施するために現在意図される最良の態様を単に例示するに過ぎないが、本発明を制限すると解釈されるべきではない。本明細書中に引用される全ての文献は、参考として明白に援用される。

#### 実施例1

##### ディリジエントタンパク質のForsythia intermediaからの精製

植物材料。Forsythia intermedia植物は、Bailey's Nursery (var. Lynwood Gold, St. Paul, MN) から入手して、ワシントン州立大学温室施設において維持するか、または地域団体からの贈られたもののいずれかであった。

最初の抽出および硫酸アンモニウム沈殿。結合タンパク質の可溶化を、4℃で

行った。冷凍Forsythia intermedia茎 (2 kg) を、液体窒素の存在下で、warrior 9 Btendor (Model CB6) において微粉砕した。得られる粉末を、5mMジチオスレイトールを含む0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH7.0, 4リットル) で均一化し、そして4層のチーズクロスを通して濾過した。不溶性残留物を、250rpmの連続攪拌で、以下のように連続して抽出した：冷却 (-20°C) 再蒸留アセトン (4リットル, 3×30分)；0.1%メルカプトエタノールを含む0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH6.5) (溶液A, 8リットル, 30分)；1% Triton X100を含む溶液A (8リットル, 4時間) および最終的に溶液A (8リットル, 16時間)。各抽出の間、残留物を、1層のMiracloth (Calbiochem) を通して濾過した。(+)β-ビノレンノール形成系の可溶化を、1M NaClを含有する溶液Aにおいて残留物を機械的に攪拌することによって達成した。ホモジネートをデカントし、そして得られる溶液を、Miracloth (Calbiochem) およびガラス繊維 (G6, Fisher Sci.) を通して連続して濾過した。濾過物を、Amiconセル (Model 2000, YM30膜) において、最終用量約800mlまで濃縮し、そして $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分画に供した。40~80%飽和のタンパク質沈殿を、遠心分離 (15,000g, 30分) によって回収し、そして $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ベレットを、必要とされるまで-20度にて保存した。

Mono Sカラムクロマトグラフィー。78kDディイリジェントタンパク質の精製およびオキシダーゼの部分精製。硫酸ベレット (2 kg) F intermedia茎から得た) を、6 M NaOHでpH5.0に調整した40mM MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸) 緩衝液 (溶液B, 30ml) で再構築し、スラリーを遠心分離し (3,600g, 5分)、そして上清を溶液B (4リットル) で一晩透析した。透析抽出物を濾過し (0.22 $\mu\text{m}$ )、そしてサンブル (35~40mgタンパク質) を、4°Cにて溶液Bで平衡化したMono S HR5/5 (50mm×5 mm) カラムにアブライした。溶液B (13ml) で溶出 (流速5 ml min<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>) した後、タンパク質を、溶液B中の以下の $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で脱着した：8 mlでの0~100mMの直線勾配を用い、そしてこの濃度で32ml維持し、次いで133mMを50ml, 166mMを50ml, 200mMを40ml, 233mMを40ml, そして最終的に333mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を40mlでの一連のステップ勾配を実行する。E-コニフェリルアルコールから(+)β-ビノレンノールを形成し得る画分を、333mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で溶出し、合わせて、必要とまで保存した (-80°C)。

POROS SP-Mマトリックスカラムクロマトグラフィー (第1カラム)。Mono S HR5/5カラム (33mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) からの15の個々の溶出物からの画分を合わせ (18.5m 9タンパク質, 180ml)、そして溶液Cに対して一晩透析した。透析した酵素溶液 (190ml) を濾過し (0.22 $\mu\text{m}$ )、そしてアニコート (47ml) を、POROS SP-Mカラムにアブライした。予め25mM MES-HEPES-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0, 溶液C) で平衡化したPOROS SP-Mマトリックス (100mm×4.6mm) での全ての分離を、60ml min<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> の流速および室温にて行った。溶液C (12ml) での溶出後、タンパク質を溶液Cにおける直線 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 勾配 (66.5ml中0から0.7M) で脱着し、ここで確立した濃度を、さらなる16.6mlについて保持した。これらの条件下で、別々の4つの画分 (I, II, III, およびIV) を、それぞれ、約40, 47, 55, および61mSで達成した。この精製工程を、残留透析酵素抽出物で3回繰り返し、そして各実験からの画分I, II, III, およびIVを別々に合わせた。プロテアーゼインヒビター (すなわち、フェニルメタンスルホンフルオリド (0.1mmol ml<sup>-1</sup>), EDTA (0.5mmol ml<sup>-1</sup>), ペプスタチンA (1 $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup>), およびアンチペイン (1 $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup>)) を、可溶化および全ての続く精製段階の間に添加した場合、画分I, II, III, およびIVの溶出プロファイルにおいて相違は観察されなかった。

POROS SP-Mマトリックスカラムクロマトグラフィー (第2カラム)。第1POROS SP-Mマトリックスカラムクロマトグラフィー工程からの画分I (2.62mgタンパク質, 40ml, 約24.6mS) を、濾過した冷蒸留水において、約8 mSの伝導率を達成するまで希釈した (最終容量=150ml)。次いで、希釈したタンパク質溶液を、POROS SP-Mカラム (100mm×4.6mm) にアブライした。溶液C (12ml) での溶出後、画分Iを、20ml中0~0.25Mの直線 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 勾配で脱着し、ここで確立した濃度を、さらに25mlについて保持した。これに続いて、26ml中0.25~0.7Mの直線 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 勾配で行い、次いでさらなる16.6mlについて0.7Mで維持した。約30mSで溶出した画分 (溶出物のイオン強度を、貫流検出器で測定した) を合わせ (15ml, 1.3mg)、水で希釈し、そして再クロマトグラフした。得られるタンパク質 (上記の勾配で約30mSで溶出した) を、必要とまで保存した (-80°C)。

ゲル濾過。画分Iからのアニコート (595.5 $\mu\text{g}$ タンパク質, 3 ml, 約30mSで溶出) を、0.6mlまで濃縮し (Centricon 10, Amicon)、そして4°Cにて50mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

を含む0.1M MES-HEPES-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で平衡化したS200 (73.2cm×1.6cm, Pharmacia-LKB) ゲルクロマトグラフィーカラムにロードした。見かけ上均一な78kDディジェントタンパク質 (242 $\mu$ g) を、133mlの単一の成分として溶出した (流速0.25ml min<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Vo=105ml)。分子量を、それらの溶出プロフィールの以下の標準タンパク質との比較によって見積もった:  $\beta$ アミラーゼ (200,000)、アルコールデヒドロゲナーゼ (150,000)、ウシ血清アルブミン (66,000)、オボアルブミン (45,000)、炭酸脱水素酵素 (29,000)、およびシトクロムC (12,400)。

#### 実施例2

##### 精製ディジェントタンパク質の特徴付け

分子量および等電点決定。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を、Laemmliの緩衝液系において、勾配 (4~15%アクリルアミド, Bio-Rad) ゲルで、酸性および還元条件下で行った。タンパク質を、銀染色によって可視化した。画分Iのゲル透過 (S200) クロマトグラフィーは、天然の分子量約78kDのタンパク質を与え、一方SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、約27kDの一本のバンドを示し、これは、天然のタンパク質が三量体として存在することを示唆する。ポリアクリルアミドゲルにおける天然のタンパク質の等電点電気泳動 (pH3~10勾配) は、6つのバンドの存在を明らかにした。等電点電気泳動後、これらのバンドの各々を、ポリビニルデンフルオリド (PVDF) 膜に電気プロットし、そしてアミノ末端配列決定に供した。これは、全てが一連のアイソフォームを示す類似の配列を有したことを確認した。タンパク質の紫外光-可視光スペクトルは、約330nmのわずかに認識できるシヨルターとともに、280nmでの特徴的なタンパク質吸収のみを有した。誘導結合型プラズマ (ICP) 分析は、タンパク質に存在する金属を全く示さなかった。従って、78kDディジェントタンパク質は、任意の抽出可能な触媒活性酸化中心を欠如する。

E-コニフェリルアルコールから(+)-ピノレシノールを形成する精製ディジェントタンパク質の能力のアッセイ。第1 POROS SP-Mカラムクロマトグラフィー工程 (実施例1) からの4つの画分 (I~IV) を、別々に再クロマトグラフィーし

各画分を、続いて、基質としてのE-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコールとの(+)-ピノレシノール形成活性について1時間アッセイした。画分I (ディジェントタンパク質を含む) は、非常にわずかな(+)-ピノレシノール形成活性 (POROS SP-Mカラムにロードした全活性の<5%) を有し、一方、画分IIは、非特異的酸化カプリングを触媒して(±)-デヒドロコニフェリルアルコール、(±)-ピノレシノール、および(±)-エリスロ/スレオオグアヤシルグリセロール8-O-4'-コニフェリルアルコールエーテルを生じた。従って、画分IIIは、内因性植物酵素添加タンパク質を含むようである。

精製オキシダーゼ調製物 (画分II) を、電気泳動的に均質まで精製しているが、このタンパク質調製物の電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルは、代表的な植物ラッカーゼ (すなわち、天然に存在する植物オキシダーゼタンパク質のクラス) のスペクトルと類似した。次いで、本発明者らは、オキシダーゼ (画分II)、78kDのディジェント (dirigent) タンパク質 (画分I) のそれぞれ、および画分IIIと78kDタンパク質の両方の存在下で、E-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコール (2 $\mu$ mol ml<sup>-1</sup>, 14.7kBq) の最終結果を研究した。画分III調製物単独では、非特異的二分子ラジカルカップリングのみが生じて、(±)-デヒドロコニフェリルアルコール、(±)-ピノレシノール、および(±)-エリスロ/スレオオグアヤシルグリセロール8-O-4'-コニフェリルアルコールエーテルを生じた。しかし、78kDタンパク質自身では、少量の(+)-ピノレシノール形成 (10時間にわたって<5%) が観察され、これは、調製物における酸化能力の残留追跡から生じると推定された。画分IIIと78kDタンパク質の両方を合わせた場合、産物中の完全な触媒活性ならびに位置特異性および立体特異性が回復され、それにより本質的に(+)-ピノレシノールのみが形成される。さらに、画分III単独で、そして画分IIIと78kDタンパク質と合わせた場合、基質消費 (depletion) および二量体産物形成の速度は、ほぼ同一であった。さらに、オキシダーゼの存在下のいずれの場合においても、試験した時間 (8時間) を通じて、二量体リグナン産物は本質的に代謝代謝回転しなかった；続く二量体酸化は、E-コニフェリルアルコール (好ましい

基質)がアッセイ混合物に存在したままの場合、生じない。それゆえ、78kDタンパク質は、二分子フェノキシノキシラジカルカップリング反応の特異性を決定する

ようである。

ゲル透過研究もまた、任意の検出可能なタンパク質-タンパク質相互作用が、立体選択性について説明し得るかどうかを確認するために、ディリジェントと画分IIIタンパク質の混合物で行った。しかし、複合体形成を指示する証拠(すなわち、より高分子のサイズ体)は、観察されなかった。

### 実施例3

#### 78kDディリジェントタンパク質の

#### 植物ラッカーゼ触媒性モノグラノールカップリングにおける効果

E-コニフェリルアルコールカップリングアッセイ。E-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコール ( $4 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 29.3kBq) を、120kDラッカーゼ (Forsythia intermedia 葉組織から以前に精製した) とともに、24時間にわたって、ディリジェントタンパク質の存在および非存在下で、以下のようにインキュベートした。各アッセイは、全容量  $250 \mu\text{l}$  の緩衝液 (0.1M MES-HEPES-酢酸ナトリウム, pH5.0) 中、E-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコール ( $4 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 29.3kBq, 7.3kBq  $\text{mol}^{-1} \text{liter}^{-1}$ ; または画分IIIとともに  $2 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 14.7kBq)、78kDディリジェントタンパク質、オキシダーゼまたは酸化剤、あるいは両方 (最終濃度: 770 $\mu\text{M}$   $\text{ml}^{-1}$  ディリジェントタンパク質; 10.7 $\mu\text{M}$   $\text{ml}^{-1}$  Forsythia ラッカーゼ; 12  $\mu\text{g}$  タンパク質  $\text{ml}^{-1}$  画分III;  $0.5 \mu\text{mol ml}^{-1}$  FAD;  $1$  および  $10 \mu\text{mol ml}^{-1}$  過酸化二硫酸アンモニウム)。酵素反応を、E-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコールの添加によって開始した。コントロールを、緩衝液のみの存在下で行った。

30℃にて振盪しながら1時間のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、放射化学キャリアとして、(±)-デノレシノール ( $7.5 \mu\text{g}$ )、(±)-デヒドロジコニフェリルアルコール ( $3.5 \mu\text{g}$ )、および(±)-エリスロ/スレオグアアシルグリセロール-8-O-4'-コニフェリルアルコールエステル ( $7.5 \mu\text{g}$ )、ならびに内部標準としてフェララ酸 ( $15.0 \mu\text{g}$ ) を含む酢酸エチル (EtOAc,  $500 \mu\text{l}$ ) で抽出し

た。遠心分離 (13,800g, 5分) 後、EtOAc可溶性成分を取り出し、そして抽出手順を、EtOAc ( $500 \mu\text{l}$ ) で反復した。各アッセイからのEtOAc可溶性成分を合わせ、溶液を真空下で吸引して乾燥し、そのアリコート ( $50 \mu\text{l}$ ) とともにメタノール-

水溶液 (1:1,  $100 \mu\text{l}$ ) に再溶解し、逆相カラムクロマトグラフィー (Waters, Nova-Pak C<sub>18</sub>,  $150\text{mm} \times 3.8\text{mm}$ ) に供した。溶出条件は以下: アセトニトリル/ $\text{H}_2\text{O}$  中3%酢酸 ( $5:95$ ) で0~5分、次いで10:90の比の直線勾配で5分と20分との間、ついで20:80で20分と45分との間で、および最後に50:50で45~60分、流速  $8.8 \text{ ml min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  であった。

E-コニフェリルアルコール、(±)-エリスロ/スレオグアアシルグリセロール-8-O-4'-コニフェリルアルコール、(±)-デヒドロジコニフェリルアルコール、および(±)-デノレシノール、に対応する画分を、別々に回収し、アリコートを液体シンチレーションカウンティングのために除去し、そして残りを凍結乾燥した。デノレシノール含有画分を、メタノール ( $100 \mu\text{l}$ ) に再溶解し、そして移動相としてヘキサノンとエタノール (1:1) の溶液を有するキラルカラムクロマトグラフィー (Daicel, Chiralcel OD,  $50\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ ) に供し (流速  $3 \text{ ml min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ )、一方、デヒドロジコニフェリルアルコール画分を、Chiralcel OF ( $25 \text{mm} \times 4.6\text{mm}$ ) カラムクロマトグラフィーに供して、移動相としてヘキサノンとイソプロパノール (9:1) の溶液で溶出 (流速  $2.4 \text{ ml min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ) し、溶出物の放射活性を、フロースルー検出器 (Radiomatic, Model A120) で測定した。

E-コニフェリルアルコールカップリングアッセイの結果。ラッカーゼ里独でのインキュベーションは、優勢な(±)-デヒドロジコニフェリルを有する、ラセミ二量体産物のみを生じた。しかし、ディリジェントタンパク質の存在下で、ラッカーゼのみが存在する場合に観察される非特異性とは異なり、このプロセスは、今や、(+)-デノレシノールを産生する一次立体選択性であった。両方のE-コニフェリルアルコール (基質) 減損の速度および二量体リグナンの形成は、ディリジェントタンパク質を伴っても伴わなくても類似であった。実質的な差異は、E-コニフェリルアルコール減損後に観察されるリグナン産物の続く代謝回転にみられ

た。ラッカーゼ単独では代謝回転を生じないが、両方のタンパク質が存在した場合は、産物の消失は顕著であった。差異を理解する目的で、ディリジエントタンパク質の重量濃度と一致したレベルのウシ血清アルブミン (BSA) およびオポアルブミンを、ラッカーゼ含有溶液に別々に添加するアッセイを行った。この方法において、産物代謝回転の差異は、高度なタンパク質濃度でのラッカーゼ活性の安定化に単純に起因することが確認されたが、興味深いことに、ディリジエントタンパク質、BSA、およびオポアルブミンは、いくらか異なる程度の保護を有した。この知見は、真菌ラッカーゼ (*Trametes versicolor* 由来) を植物ラッカーゼのかわりに使用した場合に、非常に匹敵した。酸化力 (すなわち、ラッカーゼ濃度) が5倍低い場合、(+)-ピノレシノールのみを観察した。従って、完全な立体選択性は、酸化力が、ディリジエントタンパク質が飽和する点を越えない場合に保存される。

立体選択的E-コニフェリルアルコールカップリング。アッセイをまた、E-[9- $H_3$ ,  $OC_2H_5$ ]コニフェリルアルコールおよびディリジエントタンパク質で、ラッカーゼの存在下で以下のように行った。E-[9- $H_3$ ,  $OC_2H_5$ ]コニフェリルアルコール ( $2 \mu\text{mol ml}^{-1}$ ) を、全容量  $250 \mu\text{l}$  中、ディリジエントタンパク質 ( $770 \mu\text{mol ml}^{-1}$ )、精製植物ラッカーゼ ( $4.1 \mu\text{mol ml}^{-1}$ )、および緩衝液 (0.1M MES-HEPES-pH 5.0) の存在下でインキュベートした。1時間のインキュベーションの後、反応混合物をEtOAcで、しかし、内部標準および放射性化学キャリアの添加は省いて抽出した。逆相カラムクロマトグラフィーの後、酵素的に形成したピノレシノールを回収し、蒸結乾燥し、メタノール ( $100 \mu\text{l}$ ) 中に再溶解し、そしてキラルカラムクロマトグラフィー (Daicel, Chiralcel OD,  $50\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ ) に供して、280nmで検出し、そしてEIモードにおいて質量分析フラグメント化によって分析した (Waters Integrity System)。得られた(+)-ピノレシノール (>99% 鏡像異性体過剰) の液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 分析は、荷電比 ( $m/z$ ) 368 に対する質量を有する分子イオンを生じ、従って、 $100\% H$  原子の存在を確立すること、ならびにE-[9- $H_3$ ,  $OC_2H_5$ ]コニフェリルアルコールの立体選択的カップリングに触媒されるラッカーゼおよびディリジエントタンパク

質とともに証明された。

他の補助 (auxiliary) 1電子酸化剤もまた、ディリジエントタンパク質との立体選択的カップリングを容易にし得る。過酸化二硫酸アンモニウムは、等方性分化を容易に行い (A. Usaitis, R. Makusuka, Polymer 35:4896(1994))、そしてアクリルアミドポリマー化における1電子酸化剤として日常的に使用される。過酸化二硫酸アンモニウムを、最初に、E-[9- $^3H$ ]コニフェリルアルコール ( $4 \mu\text{mol}$

$1 \text{ ml}^{-1}$ 、29.3K8q) とともに、6時間、上記のE-コニフェリルアルコールカップリングアッセイ手順を用いてインキュベートした。非特異的二分子ラジカルカップリングが観察され、優性な(±)-アピドロジコニフェリルアルコール、および他のラセミリグナンを得た (表1)。しかし、ディリジエントタンパク質を添加した場合、カップリングの立体選択性は劇的に変化して、両濃度の酸化剤で、少量のラセミリグナンとともに第一の(+)-ピノレシノールを生じた。これは、無機酸化剤 (例えば、過酸化二硫酸アンモニウム) が、たとえ面分IIIオキシダーゼまたはラッカーゼと同様にモノリグノールに対して選択的に酸化性でなくとも、ディリジエントタンパク質の存在下で(+)-ピノレシノール合成を促進し得ることを確認した。



(6)	(59)				(60)			
	非変性	変性	非変性	変性	非変性	変性	非変性	変性
変性した二量体 (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール	200 ± 4	250 ± 55	860 ± 30	1030 ± 25	61 ± 20	5 ± 1	30 ± 1	8 ± 1
変性した二量体 (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール	10 ± 1	6 ± 0	90 ± 4	30 ± 1	5 ± 1	30 ± 1	8 ± 1	8 ± 1
変性した二量体 (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール	35 ± 2	13 ± 1	250 ± 10	90 ± 3	8 ± 1	30 ± 1	8 ± 1	8 ± 1
変性した二量体 (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール	16 ± 0	0	135 ± 4	0	0	0	0	0
変性した二量体 (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール	0	130 ± 10	0	450 ± 10	55 ± 1	450 ± 10	55 ± 1	450 ± 10
変性した二量体 (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール (E)-7-ヒドロキシ- 8-オクタン-7-オール	61 ± 3	149 ± 11	475 ± 17	570 ± 14	68 ± 3	570 ± 14	68 ± 3	570 ± 14

表 1  
二酸化二酸化アセトンによって酸化されたE-コニフェリルアルコールからの産物分布  
に対するアクリルエポキシ化の効果

(FAD) とのインキュベーションの効果を調査した。なぜなら、酵素補因子としてのそれらの役割に加えて、それらはまた、種々の有機基質を酸化し得るからである (T.C. Bruice, Acc. Chem. Res. 13:256(1980))。E-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコールを、それぞれ FAD および FAD とともに、48 時間インキュベートした。FAD を得るために、ヘビ (*Naja naja atra*, Fomosan コブラ) 毒を FAD の溶液 ( $4.0 \times 10^{-5} \mu\text{mol ml}^{-1}$ ) に添加し、そして 30℃ にて 30 時間のインキュベーションの後、酵素的に形成した FAD を、Centrificon 10 (Amicon) マイクロコンセントレーターを通してフィルターによって、タンパク質混合物から分離した。どの場合も、E-コニフェリルアルコール酸化は、FAD よりも FAD の存在下でより迅速であった。FAD と FAD との間の E-コニフェリルアルコール酸化の触媒速度のこれらの差異は予測されなかったが、一致したパターンが確認された：以前のように優性である (±)-デヒドロコニフェリルアルコールとともにラセミグリグナン産物を得た。ディリジエントタンパク質の存在下で経時変化を反復した場合、本質的に (+)-ビノレシノール形成のみを生じる、立体選択性における劇的な変化が観察された。再び、E-コニフェリルアルコール消費速度は、ディリジエントタンパク質調製物における微量な残留酸化力 (10 時間にわたって < 5%) のために調整した場合、形成した二量体の総量として、[FAD] および [FAD] にのみ依存した。E-コニフェリルアルコールが全て消費される場合、対応するグリグナン二量体は、時間の関数として酸化的变化し始め得る；特に、E-コニフェリルアルコールが全て消費された後、オーブン溶液において、FAD は続いてビノレシノールを酸化し得る。

基質特異的な立体選択性の調査。カップリング立体選択性は基質特異性であった。E-p-[9-<sup>3</sup>H]クマリル ( $4 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 44.5kBg) または E-[8-<sup>3</sup>H]シナピル ( $5 \text{trapp}$ ) アルコール ( $4 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 8.3kBg) (これらは、芳香環のメトキシ基置換体によってのみ E-コニフェリルアルコールと異なる) は、ディリジエントタンパク質の存在または非存在下で、それぞれ FAD および過酸化二硫酸アンモニウムとともに 6 時間インキュベートした場合、立体選択的産物を生じた。インキュベ-

E-コニフェリルアルコールの (+)-ビノレシノールへの立体特異的な変換における他の酵素添加剤の効果。E-コニフェリルアルコール ( $4 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 29.3kBg) の、フラビンモノヌクレオチド (FAD) およびフラビンアデニンジヌクレオチド

$\mu\text{mol ml}^{-1}$ , 44, 5k8q) または  $E-[8-^{14}\text{C}]$  シナピルアルコール ( $4 \mu\text{mol ml}^{-1}$ , 8, 3k8q) を基質として使用し、そして  $30^\circ\text{C}$  にて 6 時間のインキュベーションの後、反応混合物を、放射化学的キャリアの添加なしに、EtOAc で抽出した。E-シナピルアルコールは、容易にカッピングされて、シリングレジオールを産出したが、キラル HPLC 分析により、得られる産物が、どの場合においてもラセミであることが明らかになった (表 2)。興味深いことに、それ自体により、78kD デイリジエントタンパク質製剤は、低レベルの二量体形成を触媒した (以前に記載) が、ラセミ (±)-シリングレジオール形成のみを生じた。これはおそらく、タンパク質製剤中に存在する微量な未純化した残留酸化力の結果である。

類似の模式において、立体選択的カッピングは、E-P-クマリルアルコールを基質として用いては観察されなかった。すなわち、E-コニフェリルアルコールのみが、デイリジエントタンパク質の存在下で、立体選択的カッピングを受ける。将来、デイリジエントタンパク質の E-コニフェリルアルコールについての与えられた顕著な基質特異性が *Eucommia ulmoides* において (+)-シリングレジオールを与える基質特異性とどのように異なるか、を決定することが非常に興味深い (T. Deyama, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2993 (1983))。

表 2

E-シナピルアルコールのカッピングにおける

デイリジエントタンパク質の効果 (6 時間アッセイ)

	消費したラセミ E-シナピルアルコール (770 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )	消費したラセミ E-シナピルアルコール (770 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )	消費したラセミ E-シナピルアルコール (770 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )	消費したラセミ E-シナピルアルコール (770 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )	消費したラセミ E-シナピルアルコール (770 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )
FMN	存在	570 ± 100	290 ± 40		
(0.5 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )	存在	610 ± 110	340 ± 40		
試験に 二乗誤差を (10 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )	存在	1400 ± 120	1020 ± 40		
存在	存在	1570 ± 10	1060 ± 30		
存在	存在	110 ± 10	50 ± 10		

本発明者らは、立体選択的カッピングの任意の特定の機構に束縛されることを意図しないが、3 つの別々の可能性が考えられ得る。最もありそうなのは、オキシダーゼまたは酸化剤が、E-コニフェリルアルコールからフリーラジカル種を生成すること、および後者が、カッピングの前にデイリジエントタンパク質に結合する真の基質であるということである。他の 2 つの可能性は、E-コニフェリル分子がデイリジエントタンパク質に結合および配向し、それにより、(+)-ピノレシノール形成のみが、続く酸化カッピングにおいて生じることを確認することとを必要とする：これは、両方の基質フェノールとドロキシシル基が暴露され、その結果それらが、オキシダーゼまたは酸化剤によって容易に酸化され得る場合、または、電子転移機構が、オキシダーゼまたは酸化剤とデイリジエントタンパク質の電子受容部位との間で作動性である場合、生じ得る。

3 つの別々の機構の間で、3 つの系統の証拠は、デイリジエントタンパク質によるフェノキシラジカル中間体の「捕捉」を示唆する。第 1 に、基質消費および産物形成の両方の速度は、デイリジエントタンパク質の存在によって、あまり影響されない。フリーラジカル中間体の捕捉が作動可能な機構である場合、デイリ

ジエントタンパク質は、コニフェリルアルコールの単一電子の酸化が速度決定性である場合、カッピング特異性に影響を及ぼすのみである。第 2 に、電子転移機構は現在除外される。なぜなら、本発明者らは、補助オキシダーゼまたは酸化剤の存在または非存在下のいずれにおいても、酸化条件下で、新規な紫外-可相発色団を観察しなかったからである。第 3 に、一次速度論データは (実施例 4 に議論するように)、E-コニフェリルアルコールの (+)-ピノレシノールへの変換を、デイリジエントタンパク質単独で、および種々のオキシダーゼまたは酸化剤の存在下で特徴づける、ミカエリス定数 ( $K_m$ ) および最大速度 ( $V_{max}$ ) の公式値に基づいてフリーラジカル捕捉の概念を指示する。

#### 実施例 4

デイリジエントタンパク質および酸素添加剤の存在下における

E-コニフェリルアルコールの (+)-ピノレシノールへの変換の

速度論的特徴付け

アッセイを、実施例3に記載のように、一連のE-[9-<sup>3</sup>H]コニフェリルアルコール濃度 (8.00±0.13 μmol ml<sup>-1</sup> との間、7.3MBq mole<sup>-1</sup>iter<sup>-1</sup>) を、ディリジエントタンパク質 (770pmol ml<sup>-1</sup>) 単独で、そしてForsythiaラッカーゼ (2.1pmol ml<sup>-1</sup>)、画分III (12 μgタンパク質ml<sup>-1</sup>)、またはFMN (0.5 μmol ml<sup>-1</sup>) の存在下でインキュベートすることで行った。ディリジエントタンパク質を有するアッセイを、FMNの存在または非存在下において、30℃にて1時間インキュベートし、一方、ディリジエントタンパク質の存在または非存在下におけるForsythiaラッカーゼまたは画分IIIでのアッセイを、30℃にて15分間インキュベートした。ディリジエントタンパク質によるフリーラジカルの捕捉が作動可能な機構である場合、得られるミカエリス-メンテンパラメーターは、其の値とは異なる公式値を示すのみである。なぜなら、E-コニフェリルアルコールの(+)-ビノレシノールへの変換の間の最も高いフリーエネルギー中間体状態は未だ未知であり、そして基質の濃度とオーブン溶液中の対応する中間体フリーラジカルの濃度との間の関係は、描述されていないからである。

これらの条件を考慮して、本発明者らは、ディリジエントタンパク質調製物に

ついで公式の $K_m$ および $V_{max}$ 値を評価した。初めに記したように、E-コニフェリルアルコールからの(+)-ビノレシノールおよびE-シナピルアルコールからのラセミ(+)-シリンガレジノールの両方の低レベルの形成を生じ得る。なぜか、夾雑する酸化能力の追跡のためである。この調製とともに(表3)、10±6 mMの公式 $K_m$ および0.02±0.02mol s<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>の $V_{max}$ を得た。しかし、画分III、ラッカーゼ、およびFMNの添加とともに、公式 $K_m$ 値 (mM) は、それぞれ、1.6±0.3、0.100±0.003、および0.10±0.01に減少し、一方 $V_{max}$ 値は、補助オキシダーゼ/酸化剤のこれらの濃度で、はるかに低く影響された。

公式 $K_m$ および $V_{max}$ 値を、3つのラセミシグナンへのE-コニフェリルアルコール変換の点から、ラッカーゼおよび画分IIIオキシダーゼについて計算した。しかし、78kDタンパク質への直接的比較はなし得ない。なぜなら、公式 $K_m$ 値は、対応するオキシダーゼにのみ関与するからである。完全性のために、 $K_m$  (mM) および $V_{max}$  (mol s<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>酵素) は以下のようであった：ラッカーゼに関して、(±)-

エリスロ/スレオグアヤシルグリセロール8-O-4'-コニフェリルアルコールエステルについて、0.200±0.001および3.9±0.2、(±)-デヒドロジコニフェリルアルコールについて、0.300±0.0003および13.1±0.6、ならびに(±)-ビノレシノールについて、0.300±0.002および7.54±0.50；画分IIIオキシダーゼ (80kDaの天然の分子量を有することが確認された) に関して、(±)-エリスロ/スレオグアヤシルグリセロール8-O-4'-コニフェリルアルコールエステルについて、2.2±0.3および0.20±0.03、(±)-デヒドロジコニフェリルアルコールについて、2.2±0.2および0.7±0.1、ならびに(±)-ビノレシノールについて、3.7±0.7および0.6±0.1。

これらの一次速度論パラメーターは、ディリジエントタンパク質が、画分III、ラッカーゼ、およびFMNの存在下でE-コニフェリルアルコール消費速度に実質的に影響を及ぼさなという発見と調和する。両セットの結果は、ディリジエントタンパク質が、フリーラジカル中間体を捕捉することによって機能し、次いで立体選択性カップリングを受けるという作用仮説にとともに従う。

表 3

E-コニフェリルアルコールからの(+)-ビノレシノール形成の間の  
ディリジエントタンパク質 (770pmol ml<sup>-1</sup>) についての  
公式 $K_m$ および $V_{max}$ 値における種々の酸化剤の効果

オキシダーゼ/酸化剤	公式 $K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mol s <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> タンパク質)
ディリジエントタンパク質		
画分 III (12 μg protein ml <sup>-1</sup> )	10 ± 6	0.02 ± 0.02
ラッカーゼ (2.07 pmol ml <sup>-1</sup> )	1.6 ± 0.3	0.10 ± 0.03
FMN (0.5 μmol ml <sup>-1</sup> )	0.100 ± 0.003	0.0600 ± 0.0002
	0.10 ± 0.01	0.024 ± 0.001

#### 実施例 5

Forsythia intermedia由来のディリジエントタンパク質cDNAのクローニング  
植物材料 - Forsythia intermedia植物を、Bailey's Nursery (var. Lynwood Co  
rd, St., Paul, MN) から入手し、そしてワシントン州立大学温室において施設維

持するか、または地方群落からの寄贈であったかのいずれかであった。

材料-使用したすべての溶媒および化学物質は、試薬またはHPLCグレードであった。Taq熱安定性DNAポリメラーゼをPromegaから入手し、一方、制限酵素を、Gibco BRL (HaeIII)、Boehringer Mannheim (SmaI)、およびPromega (TaqI) から入手した。p178 lucTベクターおよびコンピテントNovaBlue細胞をNovagenから購入し、そして放射標識ヌクレオチド ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) をDuPont NENから購入した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および配列決定のためのオリゴヌクレオチドプ

ライマーを、Gibco BRL Life Technologiesによって合成した。GENECLEAN II®キット (810 101 Inc.) を、1.5% アガロースゲルにおける低DNA質量ラダー (Gibco BRL) と比較することによって決定したゲル精製DNA濃度で、PCRフラグメントの精製のために使用した。

装置-UV (OD<sub>260</sub>でのRNAおよびDNA決定を含む) スペクトルを、Landa 6 UV/VIS分光光度計で記録した。Temptronic IIサーモサイクラー (ThermoLyne) を、すべてのPCR増幅のために使用した。配列決定のためのDNAの精製は、QIAquick Plusプラスミド精製システム (QIAGEN) を使用し、続いてPEG沈降を行い (Sambrook J., Fritsch, E.F., およびManiatis, T. (1994) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)、DNA配列を、Applied Biosystems Model 373A自動配列決定機を用いて決定した。アミノ酸配列を、オンラインHPLC検出を備えたApplied Biosystems バク質配列決定機を用いて、製造業者の説明書に従って得た。

ディリジェントタンパク質アミノ酸配列決定-ディリジェントタンパク質N-末端アミノ酸配列 (配列番号1) を、オンラインHPLC検出を備えたApplied Biosystems タンパク質配列決定機を用いて、精製タンパク質から得た。トリプシン消化のために、精製酵素 (150μmol) を、0.1M Tris-HCl (50μl, pH8.5, Boehringer Mannheim, 配列決定グレード) 中に懸濁し、77.5μl中8Mの最終濃度まで尿素を添加した。混合物を、15分間50℃にてインキュベートし、続いて100mMヨードアセトアミド (2.5μl) を添加し、その全体を、室温にて15分間維持した。次の

で、トリプシン (20μl中1μg) を添加し、混合物を24時間37℃にて消化し、続いてTFA (4μl) を添加して、酵素反応を停止した。得られた混合物を逆相HPLC分析 (C-8カラム, Applied Biosystems) に供し、これを、0から100%アセトニトリル (0.1% TFA中) までの2時間にわたる直線勾配で、0.2ml/分の流速にて溶出し、280nmで検出した。個々のオリゴペプチドピークを含む画分を手動で回収し、そしてアミノ酸配列決定に直接供した (配列番号2~7)。

Forsythia intermedia stem cDNAライブラリー合成-全RNA (約300μg) の新鮮な量) を温室生長 Forsythia intermedia植物 (Var. Lynwood Gold) の若い緑色茎から得た (Dong, Z.D., およびDunstan, D.I. (1996) Plant Cell Reports 15:516-

521)。Forsythia intermedia stem cDNAライブラリーを、5μgの精製ポリA<sup>+</sup> mRNA (Oligotex-d<sup>+</sup> Suspension, QIAGEN) を用いて、ZAP-cDNA<sup>®</sup> 合成キット、Uni-ZAP<sup>®</sup> XRベクター、およびGigaPack<sup>®</sup> II Goldパッケージング抽出物 (Stratagene) とともに構築し、一次ライブラリーについて1.2×10<sup>6</sup> PFUの力価を得た。増幅したライブラリー (1.2×10<sup>6</sup> PFU/ml、全量158ml) (Sambrook, Jら、前出) の一部 (30ml) を使用して、PCRのための精製cDNAライブラリーDNAを得た (Ausubee T.F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., およびStruhl, K. (1991) Current Protocols in Molecular Biology, 2つの巻, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley & Sons, NY)。

ディリジェントタンパク質DNAプロンプ合成-N-末端および内部ペプチドアミノ酸配列を使用して、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを構築した。精製F. intermedia cDNAライブラリーDNA (5ng) を、100μl PCR反応物 (10mM Tris-HCl (pH 9.0)、50mM KCl、0.1% Triton X-100、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM各dNTP、および2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ) 中、プライマー-PSINT1 (配列番号8) (100pmol)、およびプライマー-PSI7R (配列番号11) (20pmol)、プライマー-PSI2R (配列番号10) (20pmol)、またはプライマー-PSI1R (配列番号9) (20pmol) のいずれかとともに、テンプレートとして使用した。PCR増幅を、サーモサイクラーにおいて、以下のように行った: 1分94℃、2分50℃、および3分72℃の35サイクル; 72℃にて5分、および最終サイクルの後4℃にて無制限維持。1つのプライマー

、テンプレートのみ、およびプライマーのみの反応を、コントロールとして行った。PCR産物を、1.5%アガロースゲルに溶解し、ここで一本のバンド(それぞれ、約370bp、約155bp、または約125bp)が、各反応について観察された。

増幅したバンドのヌクレオチド配列を決定するために、5つの100 $\mu$ lのPCR反応を、PSINT1(配列番号8)およびPSI7R(配列番号11)、PSINT1(配列番号8)およびPSI2R(配列番号10)、ならびにPSINT1(配列番号8)およびPSI1R(配列番号9)のプライマー対を用いて上記のように、行った。各プライマー対からの5つの反応物を濃縮し(Microcon 30, Amicon Inc.)、そしてTE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA; 2 $\times$ 200 $\mu$ l)で洗浄し、続いて、PCR産物をTE緩衝液中

(2 $\times$ 50 $\mu$ l)に回収した。これらを、調製用1.5%アガロースゲル中で分離した。次いで、各ゲル精製PCR産物(約0.2 $\mu$ mol)を、pT781ueTベクターに連結し、そしてNovagenの説明書に従ってコンピテントなNova81ue細胞に形質転換した。インサートサイズを、急速煮沸溶解およびPCR技術(R20マーおよびU9マープライマーを用いる)を用いて、製造業者の説明書に従って決定した。制限分析を行い、前述のプライマー対を利用する各反応からのすべてのインサートが、同一であるかどうか、以下のように決定した: 100 $\mu$ l PCR反応物(R20マー(配列番号74)およびU9マー(配列番号75)で増幅した目的のインサート)のうち各20 $\mu$ lに、4ユニットのHaeIII、1.5ユニットのSma3a、または5ユニットのTaqI制限酵素を添加した。制限消化を、HaeIIIおよびSma3aについては37 $^{\circ}$ Cにて、ならびにTaqI反応については65 $^{\circ}$ Cにて60分進行させた。制限産物を、1.5%アガロースゲルに溶解し、試験した各インサートについて1つの制限グループを得た。PSINT1(配列番号8)およびPSI7R(配列番号11)からの5つの組換えプラスミド(pT7PSI1-pT7PSI5と称す)、およびPSINT1(配列番号8)およびPSI2R(配列番号10)からの2つの組換えプラスミド(pT7PSI6およびpT7PSI7と称す)PCR産物を、DNA配列決定のために選択した; すべてが、同じオーブンリーディングフレーム(ORF)(配列番号69)を含んだ。次に、ディリジェントタンパク質プローブを、以下のよう

に構築した: 5つの100 $\mu$ l PCR反応を、10ngのpT7PSI1 DNA(配列番号69)で、プライマー-PSINT1(配列番号8)およびPSI7R(配列番号11)を用いて上記のように

行った。ゲル精製pT7PSI1インサート(50ng)を、Pharmaciaの"QuickPrime"キットおよび $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ とともに、キット説明書に従って使用して、放射性標識プローブを生成した(0.1ml中)。これを、BioSpin 6 カラム (Bio-Rad) を通して精製し、そしてキャリアDNA (0.5mg/ml 剪断サケ精子DNA (Sigma)、0.9ml) に添加した。

ライブラリースクリーニング-600,000PFUのF.intermedia増幅cDNAライブラリーを、一次スクリーニングのために、Stratageneの説明書に従ってプレートした。ブランクを、Magna Nylon円形膜 (Micron Separations Inc.) にプロットした。

次いでこれを風乾した。膜をWhatman<sup>®</sup>3MM Chr紙の2層の間に置いた。cDNAライブラリーファージDNAを膜に固定し、そして100 $^{\circ}$ Cにて2分間迅速な排気を行いオートクレープすることによって、1段階で変性させた。膜を、6 $\times$ 標準クエン酸生理食塩水(SSC)および0.1% SDS中で37 $^{\circ}$ Cにて30分間洗浄し、そして結晶化用ディッシュ(150 $\times$ 75mm)において、予熱した6 $\times$ SSC、0.5% SDS、および5 $\times$ Dehard試薬(ハイブリダイゼーション溶液、300ml)中で57 $\sim$ 58 $^{\circ}$ Cにて穏やかに振盪しながら、5時間ブレハイブリダイズした。 $[\text{P}]$ 放射標識したプローブを変性し(煮沸、10分)、素早く冷却し(氷、15分)、そして結晶化用ディッシュ(190 $\times$ 75mm)中の予熱した新鮮なハイブリダイゼーション溶液(60ml、58 $^{\circ}$ C)に添加した。次に、ブレハイブリダイズした膜をこのディッシュに添加した。次いでこれを、プラスチックスラップで覆った。ハイブリダイゼーションを、57 $\sim$ 58 $^{\circ}$ Cにて、穏やかに浸透しながら、18時間行った。膜を、4 $\times$ SSCおよび0.5% SDSにおいて、5分間室温にて洗浄し、2 $\times$ SSCおよび0.5% SDSに移し(室温)、そして57 $\sim$ 58 $^{\circ}$ Cにて、穏やかに浸透しながら、20分間インキュベートし、プラスチックスラップで覆って乾燥を防ぎ、そして最後に増感スクリーンで-80 $^{\circ}$ Cにて24時間、Kodak X-Omat ARフィルムに暴露した。20のポジティブブランクを、上記のハイブリダイゼーション条件での2回以上のスクリーニングによって精製した。

ディリジェントタンパク質cDNA含有ファージミドインピが切除および配列決定

複製cDNAクローンを、stratageneのインデックス削除プロトコルに従って、ファージから得た。ディリジエントタンパク質をコードするいくつかの異なるcDNAの両端を、重複配列決定プライマーを用いて完全に配列決定した。2つの異なるcDNAを同定し、pPSD-F11 (配列番号12) およびpPSD-F12 (配列番号14) と命名した。配列分析: DNAおよびアミノ酸配列分析を、UnixベースのCGC Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version8, 1994年9月、Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, USA53711; Rice P. (1996) Program Manual for the ECG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge CB10 1 Rq, England) およびthe Expasy World Wide Web分子生物学用サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) を用いて行った。

#### 実施例 6

##### Spodoptera frugiperdaにおける機能的ディリジエントタンパク質の発現

*Escherichia coli* において機能的ディリジエントタンパク質を発現する試みは失敗した。従って、本発明者らは、バキュロウイルス発現系を利用して、*Spodoptera frugiperda* において、ディリジエントタンパク質を発現した。F. intermediaにおけるディリジエントタンパク質 (PSD) のための全長1.2kb cDNAクローン (これは、5'および3'未翻訳領域の両方を含む) を、プラスミドpSD-F11 (配列番号12) 由来のpBlueScript (Stratagene) から、制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびXhoIを用いて切除した。この1.2kbフラグメントを、バキュロウイルス移入ベクターpBlueBac4 (Invitrogen, San Diego, CA) のマルチクローニングサイトににおけるこれらの同じ制限部位に直接サブクローン化した。これは、6.0kb構築物pB84/PSDを産生し、これはディリジエントタンパク質cDNAの開始コドンで開始される翻訳との非融合ディリジエントタンパク質を作製する。次いで、この構築物を線状化Bac-N-Blue DNA (Invitrogen) と、*Spondoptera frugiperda* Sf9細胞に、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクションの技術によって同時にトランスフェクトして、同種組換えの手段によって産生した。組換えAutographa californica核多核体ウイルス (AcMNPV) DNA Bac-N-Blueディリジエントタンパク質

(B8/PSD) を、Invitrogenによって記載される手順に従ってブランクから複製した。最終組換えAcMNPV-B8/PSDは、多核体プロモーター制御下でPSD遺伝子を含む、そして組換えウイルスの複製に必要な必須配列を含んだ。ディリジエントタンパク質を昆虫細胞培養物において首尾良く発現されたことを検証するために、AcMNPV-PSD組換えウイルス高力価ストックで感染した対数期Sf9細胞を使用して、異種タンパク質産生を得た。最大のディリジエントタンパク質収率は、感染後48〜70時間までに生じた。SDS-PAGEおよび(+)-ビノレシノール形成活性によって決定される場合、タンパク質が培地に分泌され、そして元来Forsythia intermediaから単離された固有のタンパク質に対応する分子重および活性を示すことを見いだした。

#### 実施例 7

##### ディリジエントタンパク質クローンの

##### Thuja plicataおよびTsuga heterophyllaからの単離

Forsythiaディリジエントタンパク質cDNAのコード領域 (psd-F11 (配列番号12)) を使用して、Thuja plicataおよびTsuga heterophyllaからのcDNAライブラリーをスクリーニングした。条件および方法は、ハイブリダイゼーションを45〜50℃にて行った以外は、実施例5に記載の通りであった。2つのディリジエントタンパク質cDNAを、Tsuga heterophyllaから単離し (配列番号16、18)、そして8つのディリジエントタンパク質cDNAを、Thuja plicataから単離した (配列番号20、22、24、26、28、30、32、34)。

#### 実施例 8

##### ビノレシノール/ラリシシノールレダクタゼの

##### Forsythia intermediaからの複製

植物材料。Forsythia intermedia植物は、Bailey's Nursery (var. Lynwood Gold, St. Paul, MN) から入手して、ワシントン州立大学温室施設において維持されるか、または地成集落からの贈与物のいずれかであった。

材料。使用した全ての溶媒および化学物質は、試薬またはHPLCグレードであった。未濃縮の(+)-ビノレシノールおよび(+)-ラリシシノールを、記載のよう

に合成した (Katayama, T.ら, *Phytochemistry* 32:581-591(1993))。[4R-3H]NADPH を、以前に報告されたように、Moranらの手順 (Moran, R.G.ら, *Anal. Biochem.* 13 8:196-204(1984)) の改変 (Chu, A.ら, *J. Biol. Chem.* 268:27026-27033(1993)) に よって得、そして[4R-2H]NADPHを、AndersonおよびLinにしたがって調製した (Anderson, J.A. および Lin B.K., *Phytochemistry* 32:811-812(1993))。酵母グル コース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (DX型, 22.32mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) および 酵母ヘキソキナーゼ (F300型, 15.12mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) をSigmaから購入し、そしてジ ヒドロ葉酸レダクターゼ (Lactobacillus casei, 33.48mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) をBiopu re Co.から得た。Affi-Gel Blue Gel (100~200メッシュ) およびBio-Gel HT Hx dxyapatiteをBio-Radから購入し、一方、Phenyl Sepharose CL-4B,

MonoQ HR 5/5, MonoP HR 5/20, Superose 6, Superose 12, Superdex 75, PD-10 カラム、分子量標準、およびPolybuffer 74を、Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.から得た。アデニン2',5'-ニリン酸SephacroseおよびReactive Yellow 3 A garoseを、Sigma Chemical Co.から得た。

器械。<sup>1</sup>H核磁気共鳴スベクトル (300および500MHz) を、それぞれBruker AMX3 00およびVarian VXR500Sスベクトロメータで記録し、テトラメチルシラン (内部 標準) からの低磁場が報告される化学シフト ( $\delta$  ppm) を有する溶媒としてCDCl<sub>3</sub> を用いた。UV (OD<sub>260</sub>)でのRNAおよびDNA決定を含む) および質量スペクトルを、 それぞれ、Lambda 6 UV/VISおよびVG 7070E (イオン化電圧70eV) 分光度計で 得た。高速液体クロマトグラフィーを、逆相 (Waters, Nova-pak C18, 150×3.9 mm内径) またはキラル (Daicel, Chiralce 100またはChiralcel OC, 240×4.6mm 内径) カラムのいずれかを用いて行い、280nmで検出した (Chu, A.ら, *J. Biol. Ch em.* 268:27026-27033(1993))。放射活性サンプルを、Ecolume (ICN) において分 析し、そして液体シンチレーションカウンタ (Packard, Tricarb 2000 CA) を 用いて測定した。アミノ酸配列を、オンラインHPLC検出を備えたApplied Biosys temsタンパク質配列決定機を用いて、製造業者の説明書に従って得た。

酵素アッセイ。ピノレシノールおよびラリシレシノールレダクターゼ活性を、 (+)-[<sup>3</sup>H]ラリシレシノールおよび(-)-[<sup>3</sup>H]セコイノラリシレシノールの形成をモ

ニターすることによってアッセイした (Chu, A.ら, *J. Biol. Chem.* 268:27026-270 33(1993))。

簡単に、ピノレシノールレダクターゼ活性についての各アッセイは、(±)-ピノレシノール (MeOH中 5 mM, 20  $\mu$  l)、精製段階に対応する酵素調製物 (100  $\mu$  l)、および緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH8.0, 110  $\mu$  l) からなる。酵素反応を、[4R-<sup>3</sup>H]NADPH (10mM, 20  $\mu$  l)の二重蒸留H<sub>2</sub>O中6.79kBq/mmol) の添加によって開始 した。振盪しながら30℃にて30分のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、放射化学キャリアとして(±)-ラリシレシノール (20  $\mu$  g) および(±)-セコ イノラリシレシノール (20  $\mu$  g) を含むEtOAc (500  $\mu$  l) で抽出した。遠心分離後 (13,800×g, 5分)、EtOAc可溶物を除去し、そして抽出手順を反復した。各ア セイについて、EtOAc可溶物を、液体シンチレーションカウンタを用いるその

放射活性の決定のために、除去したアリコート (100  $\mu$  l) と合わせた。合わせた EtOAc可溶物の残留物を、減圧下でエバポレートして乾燥し、H<sub>2</sub>O中のMeOH/3% 酢酸 (30:70, 100  $\mu$  l)に再構成し、そして逆相およびキラルカラムHPLCに供した。コントローラーを、変性 (10分間煮沸した) 酵素または基質としての(±)-ピノ レシノールの非存在下のいずれかを用いて行った。

ラリシレシノールレダクターゼ活性を、(-)-[<sup>3</sup>H]セコイノラリシレシノールの 形成をモニターすることによってアッセイした。これらのアッセイを、(±)-ラ リシレシノール (MeOH中 5 mM, 20  $\mu$  l) を基質として使用し、放射化学キャリヤ として(±)-セコイノラリシレシノール (20  $\mu$  g) を添加した以外は、上記と同様 に行った。

酵素精製の一般的な手順。タンパク質精製手順を、他に示さない限りは、4℃ にて、280nmでモニターしながら、クロマトグラフィー溶出で行った。タンパク 質濃度を、Bradfordの方法 (Bradford, M.M., *Anal. Biochem.* 72:248-254(1976) によって、γグロブリンを標準として用いて決定した。ポリアクリルアミドゲル 電気泳動は、勾配 (4~15% Bio-Rad) ゲルを、変性および還元条件下で使用 し、これらは、Laemmliの緩衝液系 (Laemmli, U.K., *Nature* 227:680-685(1970) ) において行った。タンパク質を、銀染色によって可視化した (Morrissey, J.H.

Anal. Biochem. 117:307-310(1981))。  
粗抽出物の調製。F. intermediaの茎(20kg)を採集し、3~6 cm切片に切断し、そして必要なきときまで-20℃で保存した。茎のパッチ(2kg)を、液体窒素中で冷凍し、そしてWaring Blendorで粉砕した。得られた粉末を、5 mMジチオスレイトールを含むリン酸カリウム緩衝液(0.1M, pH7.0, 4 L)で均質化した。ホモジネートを、4層のチーズクロスを通して、10% (w/v) ポリビニルピロリドンを含むビーカーに濾過した。濾過物を遠心分離した(12,000×g, 15分)。得られた上清を、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で分画し、40~60%飽和のタンパク質沈殿を、遠心分離(10,000×g, 1時間)によって回収した。次に、ペレットを、5 mMジチオスレイトールを含む最小量のTris-HCl緩衝液(20mM, pH8.0) (緩衝液A)に再構成し、そして緩衝液Aで平衡化したプレパックPD-10カラム (Sephadex G-25媒体)を用いて脱塩した。

アフィニティー (Affi Blue Gel) クロマトグラフィー。粗酵素調製物 (緩衝液A中191mg, 5mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) を、緩衝液Aで平衡化したAffi Blue Gelカラム(2.6×70cm)に適用した。カラムを200mlの緩衝液Aで洗浄した後、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、緩衝液A中直鎖NaCl勾配(300ml中1.5~5M)で、流速1ml分<sup>-1</sup>にて溶出した。活性画分を、必要なき時まで保存した(-80℃)。

疎水性相互作用クロマトグラフィー (Phenyl Sepharose)。解凍後、Affi Blueクロマトグラフィー工程から得られた10の調製物(150mg, 51mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)を合わせ、そして5M NaClを含む緩衝液Aで平衡化したPhenyl Sepharoseカラム(1×10cm)に適用した。カラムを、2粒容積の同じ緩衝液で洗浄した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、緩衝液A中のNaClの減少濃度の直線勾配(40ml中5~0M)を用いて、流速1ml分<sup>-1</sup>にて溶出した。ビノレシノール/ラリシレシノール還元を触媒する画分を合わせて、そしてブールした。

ヒドロキシアパタイトIクロマトグラフィー。Phenyl Sepharose精製工程からの活性タンパク質(31mg, 91mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)を、5mMジチオスレイトールを含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0) (緩衝液B)で平衡化した、ヒドロキシ

アパタイトカラム(1.6×70cm)に適用した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の直線勾配(200ml中0.01~0.4M)で、流速1ml分<sup>-1</sup>にて溶出した。活性画分を合わせた。次いで、緩衝液を、PD-10プレパックカラムを用いて、緩衝液Aと交換した。

アフィニティー (2'5'-ADP Sepharose) クロマトグラフィー。次に、ヒドロキシアパタイト精製工程から得られる酵素溶液(6.5mg, 463mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)を、2.5mM EDTAを含む緩衝液A (緩衝液')で事前に平衡化した、2'5'-ADP Sepharose (1×10cm)カラムにロードし、次いで、25mlの緩衝液A'で洗浄した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、緩衝液A'中のNADP<sup>+</sup>の段階勾配(10ml中0.3mM)で、流速0.5ml分<sup>-1</sup>にて溶出した。(NAD<sup>+</sup>(3mM)までは、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ活性を溶出しなかった。) NADP<sup>+</sup>の吸光度の影響で、280nmで溶離液を直接モニターするのは不可能であった。各画分についてのタンパク質濃度を、Bradford (Bradford, M.M., Anal. Biochem. 7

2:248-254(1976))に従って分光光学的に決定した。

ヒドロキシアパタイトIIクロマトグラフィー。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ活性を示す2'5'-ADP Sepharoseカラムからの画分(0.85mg, 1051mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)を合わせ、そして緩衝液Bで平衡化した第2ヒドロキシアパタイトカラム(1×3cm)に直接適用し、リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の直線勾配(45ml中0.01~0.4M)で、流速1ml分<sup>-1</sup>にて酵素を溶出した。

アフィニティー (Affi Yellow) クロマトグラフィー。次に、第2ヒドロキシアパタイトカラム精製工程からの活性画分(160μg, 7960mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)を、緩衝液Aで平衡化した、Reactive Yellow 3 Agarose column (1×3cm)に適用した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、直鎖NaCl勾配(100ml中0~2.5)で、流速1ml分<sup>-1</sup>にて溶出した。

高速タンパク質液体クロマトグラフィー (Fast Protein Liquid Chromatography) (Superose 12クロマトグラフィー)。最高の活性を有するAffi Yellow精製工程からの合わせた画分(50μg, 10,940mmol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)をブールし、そしてCentricon 10微小濃縮器 (Amicon, Inc.)を用いて、1mlに濃縮した。次いで、酵



素溶液を、 $200\mu\text{l}$ ずつ、高速タンパク質液体クロマトグラフィーカラム (Superose 12, HR10/30) に適用した。ゲル濾過を、 $20\text{mM Tris-HCl}$  (pH8.0)、 $150\text{mM NaCl}$ 、および  $5\text{mM}$  ジチオサスレイトールを含む緩衝液において、流速  $0.4\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  にて行った。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、 $12.8\text{ml}$ の移動相で溶出した。UVプロファイル ( $280\text{nm}$ での吸光度) と一致する活性な画分をブールし ( $20\mu\text{g}$ ,  $15,300\text{nmol l}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )、そして脱塩した (PD-10プレバックカラム)。

前述の精製プロトコルは、(+)-ビノレシノール/ (+)-ラリシレシノールレダクターゼの3060倍の精製をもたらした。フェニルプロパノイド代謝に関与する多くの酵素についてのように、タンパク質は非常に少ない含有量である。すなわち、 $20\text{kg}$ の F. intermedia の茎は、精製 (+)-ビノレシノール/ (+)-ラリシレシノールレダクターゼを約  $20\mu\text{g}$  しかもたらさなかった。

#### 実施例 9

Forsythia Intermedia からの精製ビノレシノール/ラリシレシノールレダクター

#### ゼの特徴付け

等電点およびPI決定。精製プロトコルの全段階において、(+)-ビノレシノール/ (+)-ラリシレシノールレダクターゼ活性は同時溶出した。この観察を考えると、タンパク質の1つを超える形態が存在したかどうか (すなわち、タンパク質の1つの形態がビノレシノールの還元を触媒し、そしてそのタンパク質の別の形態がラリシレシノールの還元を触媒したかどうか) を明白に確認することが必須であった。この目的のため、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの等電点を、MonoP HR 5/20 FPLCカラムで等電点電気泳動することによって確立した。

Superose 12ゲル濾過カラム (実施例1) からの活性な画分をブールし、そして同じ緩衝液で平衡化したプレバック PD-10カラムを用いて、 $25\text{mM Bis-Tris}$  (pH 7.1) で緩衝液交換した。このように得られた調製物を、等電点電気泳動カラムにロードし、そして  $7.1\sim 3.9$  の pH 勾配を、溶出液として Polybuffer 74を用いて、流速  $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  にて形成した。各画分のアリコート ( $200\mu\text{l}$ ) を、ビノレシノ

ール/ラリシレシノールレダクターゼ活性についてアッセイした。画分の残留物を使用して、pH勾配を決定した。

分子量決定。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの MonoP HR 5/20 FPLCカラム調製物の、SDS-勾配ゲル電気泳動 ( $4\sim 15\%$  ポリアクリルアミド) への適用によって、類似の見かけの分子量の2つのタンパク質バンドの存在が明らかになった。この分離を、MonoQ HR 5/5 FPLCマトリックスにおける陰イオン交換クロマトグラフィーを介して達成した。Superose 12精製工程 (実施例1) からブールした画分を、緩衝液Aで平衡化した MonoQ HR 5/5カラム (Pharmacia) に適用した。カラムを、 $10\text{ml}$ の緩衝液Aで洗浄し、そしてビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ活性を、緩衝液A中の直線NaCl勾配 ( $50\text{mM}$  中  $0\sim 50\text{mM}$ ) で、流速  $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  にて溶出した。回収した画分のアリコート ( $30\mu\text{l}$ ) を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、勾配 ( $4\sim 15\%$  アクリルアミド) ゲルを用いて分析した。タンパク質を銀染色によって可視化した。活性画分  $34\sim 37$  ( $27,760\text{nmol l}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) および  $38\sim 41$  ( $30,790\text{nmol l}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) を別々にブールし、そしてこれをすぐ用いて特徴付けた。

変性条件下でこのように分離した2つのタンパク質バンドは、それぞれ、約36および約35kDaの見かけ上の分子量を有した。2つのレダクターゼ形態の各々は、 $pI$  約5.7を有した。

各レダクターゼイソ型の天然の分子量を、Superose 12, Superose 6、および Superdex 75ゲル濾過FPLCカラムにおけるそれらの溶出挙動の、校正分子量標準の溶出挙動との比較を介して推定した。ゲル濾過を、実施例8に示すように行った。各レダクターゼについて、 $59,000$  の見かけ上の天然の分子量を、その溶出容量に基づいて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による約36,000および約35,000と比較して算出した。ゲル濾過およびSDS-PAGEからの分子量の間の矛盾は未知のままであるが、天然のタンパク質はダイマーとして存在するようであるが、非対称形のモノマーとしてもまた存在し得、それによりその有効ストークス半径を変更すること (Cantor, C.R., および Shimmell, P.R., Biophysical Chemistry, 第1部, W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA (1980); Stettin, E., Met

hods in Enzymology 182:317-328(1990)) が、ヒトオレドキシニンレダクターゼ (Obong, J.E.ら, Biochemistry 32:7271-7277(1993)) および酵母メタロエンドペプチドブチターゼ (Hrycyna, C.A., およびClarke, S., Biochemistry 32:11293-11301(1993)) について報告されたように、試験的に提案され得る。

pH至適および温度至適。ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのpH至適を決定するために、ゲルSuperose 12透過工程 (実施例8) からの酵素調製物を、緩衝液を、6.3~9.4のpH範囲の50mM Bis-Trisプロパン緩衝液で置換したことを除いて、標準的なアッセイ条件 (実施例8) を利用してアッセイした。pH至適は、pH7.4であることが見いだされた。

ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの温度至適を、4℃~80℃の範囲において、標準的なアッセイ条件 (実施例8) 下で、ゲル透過工程 (実施例8) からの酵素調製物を利用して実験した。至適pHで、レダクターゼ活性についての温度至適を、約30℃であることを確立した。

反応速度論パラメーター。速度研究を行い、2つのレダクターゼイソ型が別々の還元を触媒するかどうか (すなわち、それぞれ、(+)-ピノレシノールから(+)-

ラリシレシノール、および(+)-ラリシレシノールから(-)-セコイソラリシレシノールの変換)、または基質として(+)-ピノレシノールまたは(+)-ラリシレシノールのいずれかへの優先性を提示するかどうかを確認した。最初の速度研究を、酵素の2つのイソ型を別々に利用し、そして基質として(+)-ピノレシノールおよび(+)-ラリシレシノールの両方を別々に使用して行った。最初の速度研究を、3連の実験において、5 mMジチオスレイトールを含む50mM Bis-Trisプロパン緩衝液 (pH7.4)、純粋な酵素 (MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー後)、定常NA DH濃度 (80  $\mu$ M) での10の異なる基質濃度 (8.8~160  $\mu$ M) を用いて行った。インキュベーションを、30℃にて10分間 (直線速度論範囲内) 行った。反応速度論パラメーターを、Lineweaver-Burkプロットから決定した。

重要なことに、反応速度論パラメーターは、酵素の35kDaおよび36kDa形態の両方について本質的に同じであった (すなわち、ピノレシノールについての $K_m$ 、酵素の35kDa形態について $27 \pm 1.5 \mu$ M、および酵素の36kDa形態について $23 \pm 1.3 \mu$ M

;ラリシレシノールについての $K_m$ ：酵素の35kDa形態について $121 \pm 5.0 \mu$ M、および酵素の36kDa形態について $123 \pm 6.0 \mu$ M)。類似の様式において、見かけ上の最大速度 (タンパク質の $\mu$ mol h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>として表される) もまた、本質的に同一であった (すなわち、ピノレシノールについての $V_{max}$ ：酵素の35kDa形態について $16.2 \pm 0.4$ 、および酵素の36kDa形態について $17.3 \pm 0.5$ ; ラリシレシノールについて：酵素の35kDa形態について $25.2 \pm 0.7$ 、および酵素の36kDa形態について $29.9 \pm 0.7$ )。従って、全ての入手可能な証拠は、(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼが、2つのイソ型として存在し、その各々が同基質の還元を触媒し得ることを示唆する。この還元がどのように行われるか (すなわち、両還元が、並行になされるか、キノンまたはフラノ環形態のいずれかにおいてなされるかどうか)、より豊富なタンパク質供給源を用いるさらなる研究が待たれる。

(+)-[7'R',4'H]ラリシレシノールの酵素形成。2つの(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼイソ型が、本質的に同一の触媒特徴を示したので、Sephacrose 12酵素調製物 (実施例8) (両イソ型を含む) を使用して、水素化物移入の立体特異性を実験した。適したストラテジーは、(+)-ピノレシノールの選

元のための補因子としてNADPHを用いる選択的重水素標識を利用し、酵素産物 (+)-ラリシレシノール) を、<sup>1</sup>H NMRおよび質量分析によって分析した。従って、(+)-ピノレシノールの溶液 (MeOH中5.2mM, 4 ml) を、Tris-HCl緩衝液 (20mM, pH8.0, 5 mMジチオスレイトールを含む, 22mM) に添加し、そしてAndersonおよびLinの方法 (Anderson, J.A., およびLin B.K., Phytochemistry 32:811-812(1993)) を介して立体特異性重水素標識化[4R',4'H]NADPH (H<sub>2</sub>O中20mM, 4 ml) を調製し、その全体を酵素調製物 (20ml) に添加した。振盪しながら30℃にて1時間のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、EtOAc (2  $\times$  50ml) で抽出した。EtOAc可溶性画分を合わせ、飽和NaCl (50ml) で洗浄し、乾燥させ (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、そして減圧下でエバポレートして乾燥させた。得られる抽出物を、最小量のEtOAcに再溶解し、シリカゲルカラム (0.5  $\times$  7 cm) に適用し、そしてEtOAc/ヘキサン

(1:2) で溶出した。酵素産物を含む画分を合わせ、そしてエバポレートして乾燥させた。

酵素産物を、重水素によるその置換に起因する $\delta$ 2.51ppmでの7'-プロボロプロトンの消滅によって、そしてC-7での1つの重水素原子の存在に対応する (m/z) 361 (M+1) でのその分子イオンによって証明されるように、(+)-[7'-R<sup>2</sup>H]ラリシレシノールであることを確認した。

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz) (CDCl<sub>3</sub>): 2.39 (m, <sup>1</sup>H, C9H), 2.71 (m, <sup>1</sup>H, C8H), 2.88 (d, <sup>1</sup>H, J7S,8=5.0 Hz, C7HS), 3.73 (dd, <sup>1</sup>H, J8,9=7.0 Hz, J9,9'=8.5 Hz, C9'HD), 3.76 (dd, <sup>1</sup>H, J8,9S=6.5 Hz, J9R,9S=8.5 Hz, C9HS), 3.86 (s, <sup>1</sup>H, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, <sup>1</sup>H, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (dd, <sup>1</sup>H, J8,9R=6.0 Hz, J9R,9S=9.5 Hz, C9'HR), 4.04 (dd, <sup>1</sup>H, J8,9'=7.0 Hz, J9,9'=8.5 Hz, C9'HD), 4.77 (d, <sup>1</sup>H, J7,8=6.6 Hz, C7H), 6.68 - 6.70 (m, <sup>1</sup>H, AH), 6.75 - 6.85 (m, 4H, AH); MS m/z (%): 361 (M+1, 71.2), 360 (M+, 31.1), 237 (11.1), 153 (41.5), 152 (20.2), 151 (67.0), 138 (100), 137 (71.1).

従って、(+)-ピノレシノールから(+)-ラリシレシノールへの水素化物移入は、(+)-ラリシレシノールの7'-プロボロの水素位置のみを重水素化される様式において生じた。類似の結果が、(+)-ラリシレシノールの(-)-セコイソラリシレシノールへの変換についても観察され、それにより、全体の水素化物移入は、完全に立体特異性であることが確認された。

#### 実施例10

##### Forsythia intermediaから精製した

##### ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのアミノ酸配列分析

ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのアミノ酸配列決定。(+)ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼN-末端アミノ酸配列を、オンラインHPLC検出器を備えたApplied Biosystemsタンパク質シーケンサーを用いて、精製タンパク質の各々および両方の混合物から得た。N-末端配列は、両アイソフォームについて同一であった (配列番号36)。

トリブリン消化のために、Sephacrose 12カラムから精製した酵素 (実施例8) の150pmolを、0.1M Tris-HCl (50  $\mu$ l, pH8.5) に懸濁し、尿素を添加して、77.5  $\mu$ lにおける最終濃度を8Mにした。混合物を50°Cにて15分間インキュベートし、

次いで100mMヨードアセトアミド (2.5  $\mu$ l) を添加し、その全体を室温にて15分間維持した。次いで、トリブリン (20  $\mu$ l中1  $\mu$ g) を添加し、混合物を37°Cにて24時間消化し、その後、TFA (4  $\mu$ l) を添加して、酵素反応を停止した。

得られた混合物を、逆相HPLC分析 (C-8カラム、Applied Biosystems) に供し、これを、2時間にわたって、0から100%のアセトニトリル (0.1% TFA中) の直線勾配で、流速0.2ml/分にて溶出し、280nmで検出した。個々のオリゴペプチドピークを含む画分を手動で回収し、そしてアミノ酸配列決定を直接受けさせた。4つのトリブリン処理フラグメントを、十分な量に分離して、アミノ酸配列決定を可能にした (配列番号37~40)。

臭化シアニン消化を、Sephacrose 12カラムから精製したレダクターゼ (実施例8) の150pmolの、70%硫酸中0.5M臭化シアニンとの、37°Cにて40時間のインキュベーションによって行い、続いて臭化シアニンおよび硫酸を、減圧下での遠心分離 (SpeedVac) によって除去した。得られたオリゴペプチドフラグメントを、HPLCによつて分離し、そして3つを、十分な量に分離して、配列決定を可能にした (配列番号41~43)。

#### 実施例11

##### Forsythia intermediaからの

##### ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのクロニンゲ

植物材料。Forsythia intermedia植物は、Bailey's Nursery (var. Lynwood Gold, St., Paul, MN) から入手して、ワシントン州立大学温室施設において維持したが、または地域団体からの贈られたかのいずれかであった。

材料。使用した全ての溶媒および化学物質は、試薬級またはHPLC級であった。OD<sub>220</sub>でのUV RNAおよびDNA決定を、 $\lambda$  260 nm/UV分光光度計で得た。Temptronic Iサーモサイクラー (ThermoLyne) を、全てのPCR増幅に使用した。Taq熱安定性DNAポリメラーゼを、Promegaから得、一方、制限酵素を、Gibco BRL (Gaithersburg, MD) から得、Boehringer Mannheim (Sau3a)、およびPromega (TaqI) から得た。pT78TベクターおよびコンピテントなNovaBlue細胞を、Novagenから購入し、そして放射線標識ヌクレオチド ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPおよび[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP) を、DuPont NENから購

入した。

ポリメラゼ連鎖反応 (PCR) および配列決定のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、Gibco BRL Life Technologiesによって合成した。GENECLEAN II® キット (BIO 101 Inc.) を、PCRフラグメントの精製に使用し、ゲル精製DNA濃度を、1.5% アガロースゲルにおける低DNA質量ラダー (Gibco BRL) と比較することによって決定した。

Forsythia RNA単離。迅速に生長する緑色茎組織から機能的F-Intermédia RNAを単離する最初の試みは、不成功であった。これは、その植物フェノール性成分による容易な酸化を介して遭遇する困難に起因する。しかし、この問題は、RNA単離手順 (特に木本植物組織について設計され、これは、酸化を防ぐために、抽出緩衝液において低pHおよび還元条件を使用する) の利用によって、首尾よく克服された (Dong, Z.D., およびDunstan, D.I., Plant Cell Reports 15:516-521(1996))。

Forsythia intermedia茎cDNAライブラリー合成。全RNA (約300  $\mu$ g/新鮮重量) を、温室で生長させたForsythia intermedia植物 (var. Lynwood Gold) の若い緑色の茎から得た (Dong, Z.D., およびDunstan, D.I., Plant Cell Reports 15:516-521(1996))。

5:516-521(1996))。Forsythia intermedia茎cDNAライブラリーを、5  $\mu$ gの精製

ポリA+ mRNA (Oligotex-d<sup>TM</sup> Suspension, QIAGEN) を用いて、ZAP-cDNA®合成キット、Uni-ZAP<sup>TM</sup>XRベクター、およびGigapack®II Gold packaging extract (Stratagene) とともに構築し、 $1.2 \times 10^9$  PFUの力価を有する一次ライブラリーを得た。増幅したライブラリー ( $1.2 \times 10^9$  PFU/ml; 全158ml) の一部 (30ml) を使用して、PCRのための純粋なcDNAライブラリーDNAを得た (Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1994); Ausubel, F.M., Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, NY(1991))。

ビノシノール/シリシノールレダクターゼcDNAプローブ合成-N末端および内部ペプチドアミノ酸配列を使用して、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを

構築した。詳細には、プライマー-PLRN5 (配列番号44) は、N-末端ペプチド (配列番号36) のアミノ酸7~13の配列に基づいた。プライマー-PLRL4R (配列番号45) は、(配列番号37) に示される内部ペプチド配列のアミノ酸2~8の配列に基づいた。プライマー-PLRL5R (配列番号46) は、(配列番号37) に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列に基づいた。配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列 (プライマー-PLRL5R (配列番号46) の配列がこれに基づく) はまた、配列番号41に示される臭化シアニド作製内部フラグメントのアミノ酸4~10の配列に対応した。

精製F-Intermédia cDNAライブラリー-DNA (5 ng) を、100  $\mu$ l PCR反応物 (10mM Tris-HCl (pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 各0.2mMのdNTP, および2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ) におけるテンプレートとして、プライマー-PLRN5 (配列番号44) (100pmol) と、ならびにプライマー-PLRL5R (配列番号46) (20pmol) またはプライマー-PLRL4R (配列番号45) (20pmol) のいずれかとともに使用した。PCR増幅を、サーモサイクラーにおいて、以下のように行った: 94℃にて1分、50℃にて2分、および72℃にて3分の35サイクル; 72℃にて5分、そして最終サイクル後、4℃にて無期限に維持した。シングルプライマー、テンプレートのみ、およびプライマーのみの反応を、コントロールとして

行った。PCR産物を、1.5% アガロースゲルで分離した。プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL4R (配列番号45) の組合せは、380bpの単一のバンドを生じた。これは配列番号47の塩基22~393に対応する。プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL5R (配列番号46) の組合せは、400bpの単一のバンドを生じた。これは配列番号47の塩基22~423に対応する。

2つの増幅したバンドのヌクレオチド配列を決定するために、5つの100  $\mu$ l PCR反応を、以下のテンプレートとプライマーの各々の組合せで、上記のように行った: 380bp増幅産物+プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL4R (配列番号45); 400bp増幅産物+プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL5R (配列番号46)。プライマーおよびテンプレートの各組合せからの5

つの反応物を濃縮し (Microcon 30, Amicon Inc.)、そしてTE緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA;  $2 \times 200 \mu\text{l}$ ) で洗浄し、PCR産物を、TE緩衝液 ( $2 \times 50 \mu\text{l}$ ) に混いて回収した。これらを、分取用1.5%アガロースゲルで分離した。次いで、各ゲル精製PCR産物 (約0.2pmol) を、pT7BlueTベクターに連結し、そしてNovagenの説明書に従ってコンピテントなNovaBlue細胞に形質転換した。インサートサイズを、急速煮沸溶解およびPCR技術を用いて決定した (R20マー (配列番号74) およびU19マー (配列番号75) プライマーを、製造業者 (Novagen) の説明書にしたがって利用する)。

制限分析を行い、プライマーおよびテンプレートの各組合せに対して全てのインサートが同じであるかどうか決定した。制限分析を以下のように行った: 各インサートを、R20 (配列番号74) およびU19 (配列番号75) プライマーを利用して、PCRによって増幅した。 $100 \mu\text{l}$  PCR反応物の各 $20 \mu\text{l}$ に、4ユニットのHaeIII、1.5ユニットのSmaI、または5ユニットのTaqI制限酵素を添加した。制限消化を、HaeIIIおよびSmaIについては37°Cにて、およびTaqI反応については65°Cにて60分間進行させた。制限産物を、1.5%アガロースゲルで分離し、試験した全てのインサートについて1つの制限グルーブを生じた。

得られる組換えプラスミドのうちの5つを、DNA配列決定のために選択した。3つの組換えプラスミド (pT7PLR1~pT7PLR3と呼ばれる) からのインサートを、基質としての400bp PCR産物とともに、プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプ

ライマー-PLRI5R (配列番号46) の組合せによって作製した。残りの2つの組換えプラスミド (pT7PLR4およびpT7PLR5と呼ばれる) からのインサートを、基質としての380bp PCR産物とともに、プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRI4R (配列番号45) の組合せから作製した。5つ全ての配列決定したPCR産物は、同じオーブンリーディングフレームを含んだ。

(+)-デノレシノール/(+)-ラリレシノールレダクタゼプローブを、以下のようにつづらした: 5つの $100 \mu\text{l}$  PCR反応を、10ngのpT7PLR3 DNAとともに、プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRI5R (配列番号46) とともに、上記のように行った。ゲル精製pT7PLR3 cDNAインサート (50ng) を、Pharmacia

のT7QuickPrimeキットおよび $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ とともに、キット説明書に従って使用して、放射性標識プローブを産生した ( $0.1\text{mM}$ )。これを、BioSpin 6カラム (Bio-Rad) を通して精製し、そしてキャリアDNA (Sigma) から得た $0.5\text{mg/ml}$ 剪断サケ精子DNAの $0.9\text{ml}$ ) に添加した。

ライブラリースクリーニング。600,000PFUのF.internedia増幅cDNAライブラリーを、Stratageneの説明書にしたがって、一次スクリーニングのためにプレートした。ブラークを、Magna Nylon膜サークル (Micron Separations Inc.) にプロットし、次いでこれを風乾した。膜を、Whatman@3MM Chr紙の2層の間にのせた。cDNAライブラリー-ファージDNAを膜に固定し、そして100°Cにて2分間のオートクレーブによって、迅速な消耗で1工程において変性した。膜を、 $6 \times$ 標準クエン酸生理食塩水 (SSC) および $0.1\%$  SDSにおいて37°Cにて30分間洗浄し、そして結晶化皿 ( $190 \times 75\text{mm}$ ) において、予熱した $6 \times$  SSC、 $0.5\%$  SDS、および $5 \times$  Denhar d塩液 (ハイブリダイゼーション溶液、300ml) において57~58°Cにて5時間穏やかに振盪しながらブレハイブリダイズした。

$[\text{P}^{32}]$ 放射性標識プローブを変性し (煮沸、10分)、素早く冷却し (氷、15分)、そして結晶化皿 ( $150 \times 75\text{mm}$ ) 中の予熱した新鮮なハイブリダイゼーション溶液 ( $60\text{ml}$ , 58°C) に添加した。次に、ブレハイブリダイズした膜を、この皿に添加し、次いでこれを、プラスチックラックで覆った。ハイブリダイゼーションを、穏やかに振盪しながら57~58°Cにて18時間行なった。膜を $4 \times$  SSCおよび $0.5\%$  SDSにおいて室温にて5分間洗浄し、 $2 \times$  SSCおよび $0.5\%$  SDS (室温) に移し、

そして穏やかに振盪しながら57~58°Cにて20分間インキュベートし、乾燥を防ぐためにプラスチックラックで覆い、そして最後に、増感スクリーンとともに、-80°Cにて24時間Kodak X-OMAT ARフィルムに曝露した。

このスクリーニング手順は、350を超えるポジティブなブラークを生じ、20 (異なるシグナル強度) を、さらなる2回のスクリーニングに供した。最終精製の後、20のcDNAのうち6つを、インジボ切り出しによってpBluescriptにサブクローニング化した。これらの6つのcDNAを、pTr-F11~pTr-F16と呼んだ (配列番号47、49、51、53、55、57)。

p1r-F11-p1r-F16ファージミドのインピンボ切り出しおよび配列決定。6つの複製cDNAクローンを、Stratageneのインピンボ切り出しプロトコルにしたがって、ファージからレスキューした。(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼをコードする6つの異なるcDNA (p1r-F11-p1r-F16) の両鎖を、重複配列決定プライマーを用いて、完全に配列決定した。

配列決定のためのDNAの精製は、QIAwell Plusプラスミド精製システム (QIAGEN) を使用して、続いてPEG沈殿 (Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) を行い、DNA配列は、Applied Biosystems Model 373A自動シーケンサーを用いて決定した。DNAおよびアミノ酸の配列分析を、UnixベースのGCG Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8.19, 94年9月, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711; Rice, P., Program Manual for the ECG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1RQ, England (1996)) およびEXPASY World Wide Web分子生物学サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) を用いて行った。

全ての6つのcDNAは、同じコード領域であるが、異なる5'非翻訳領域を有した。一方、6つのcDNAの各々の3'非翻訳領域の分析は、全てが、最長cDNAの3'領域の短縮化バージョンであることを確認した。温室で生育させた植物の茎頂からの全RNAでの事前のRNAゲルプロット分析は、約1.2kbの長さの単一の転写物を確認した。

RNAゲルプロット分析。RNAゲルプロット分析のために、F. intermedia茎頂からの全RNA (1レーンあたり30μg) を、サイズによって、変性アガロースゲル電気泳動によって分離した。RNAを、荷電したナイロン膜 (GeneScreen Plus®, Dupont NEN) に移し、膜 (StratageneからのStratalinker) に架橋し、ブレイハイブリダイズし、cDNAクローニングの間にcDNAライブラリーをスクリーニングするのに使用した同じプロトコルとハイブリダイズし、そして水性ハイブリダイゼーション条件についての製造業者の説明書に従って洗浄した。次いで、膜を、増感スクリ

ーンとともに、-80℃にて48時間Kodak X-OMATフィルムに曝露した。

# 実施例12

## (+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼcDNA p1r-F11の

### E. coliにおける発現

Escherichia coliにおける発現。推定(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼcDNAにコードされる機能的(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼを確認するために、おそらく(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼをコードするcDNAを、E. coliにおいて異種発現した。異種発現はまた、将来、(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼの正確な生化学機構の系統的な研究を可能にするための十分なタンパク質を得るために、必要であった。

6つの推定(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼクローンの実験は、1つ (p1r-F11 (配列番号47)) が、pBluescriptにおけるβガラクトシダーゼのα相補性粒子とインフレーションにあることを明らかにした。これは、思いがけないことであった。なぜなら、容易な手段を潜在的に提供して、完全に機能的な融合タンパク質を発現し、従ってクローン化配列が正しいことの証拠を提供するからである。

p1r-F11 (配列番号47) からの精製プラスミドDNAを、Novagenの説明書にしたがって、NovaBlue細胞に形質転換した。形質転換細胞 (5ml培養物) を、37℃にて振盪しながら (225rpm)、中期対数期 ( $OD_{600} = 0.5$ ) まで、 $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  テトラサイクリンおよび $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  アンピシリンを補充したLB培地 (Sambrook, J., M

ol

olecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) 中で増殖させた。次いで、IPTG (インプロピルβ-D-チオオグルコピラノシド) を最終濃度100mMまで添加して、そして細胞を2時間増殖させた。細胞を遠心分離によって回収し、そして $500 \mu\text{l}$  (5ml培養管あたり) 緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH8.0, 5mMジチオスレイトール) に再懸濁した。次に、リゾチーム ( $5 \mu\text{l}$  of  $0.1 \text{mg ml}^{-1}$ , Research Organics, Inc

・) を添加し、そして緑いて10分間インキュベーションし、細胞を超音波処理によって溶解した(3×15秒)。14,000×gで4℃にて10分間の遠心分離の後、上清を取り出し、そして(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼ活性について、実施例8に記載のようにアッセイした(1アッセイあたり210 $\mu$ l上清)。

触媒活性を、無細胞抽出物を、30℃にて2時間、(±)-ビノレシノール(0.4mM)および[4R-<sup>3</sup>H]NADPH(0.8mM)とともに、標準的な条件下でインキュベートすることによって確認した。インキュベーションに続いて、未標識(±)-ラリシレシノールおよび(±)-セコインラリシレシノールを、放射化学キャリアとして添加し、各リダナンを逆相HPLCによって単離した。コントロールは、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼcDNAのアッセイを含む。これは、フレーム外のcDNAインサート(全てのアッセイ成分を含む)ならびにpIrr-F11(配列番号47)およびフレーム外のビノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼcDNAを、[4R-<sup>3</sup>H]NADPH以外の基質を伴わずに含む。産物の分離およびキララ同定を、以前に記載される(Chu, A., ら, J. Biol. Chem. 268:27026-27033(1993))ように、HPLCによって行った。

続くキララHPLC分析は、(+)-ラリシレシノールおよび(-)-セコインラリシレシノールの両方(しかし、対応する対掌体ではない)が、放射性標識されていることを明らかにした(総活性: 54nmol hr<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)。対照的に、(±)-ビノレシノールの非存在下、またはcDNAインサートがβガラクトシターゼ遺伝子とインフレームに存在しないプラスミドを含むコントロール細胞を使用した場合ではいずれも触媒活性は検出されなかった。従って、異種発現された(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼおよび植物タンパク質は、正確に同じ鏡像時

異的(enantiospecific)様式で機能する。

#### 実施例13

(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼをコードするクローンpIrr-F11(配列番号47)のcDNAインサートの配列および相同性分析配列分析。クローニング(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼ

ゼpIrr-F11(配列番号47)の全長配列は、消化フラグメントのエドマン分解によって決定したペプチド配列のすべてを含んだ。

単一のORFにより、34.9kDaの計算分子量を有する312アミノ酸のポリペプチド(配列番号48)が推測され、これは、(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼの2つのアミノフォームについてSDS-PAGEによって以前に推定した値(約35kDaまたは約36kDa)にほぼ一致する。等しい数の酸性および塩基性残基もまた存在し、等電点クロマトグラフィーによって実験的に得られた等電点(pI約5.7)とは対照的に、7.09の理論的等電点(pI)を有する。

アミノ酸組成は、7つのメチオニン残基を明らかにする。興味深いことに、植物から精製した酵素のN-末端は、最初のメチオニンを欠如する。これは、公知の最も一般的な翻訳後タンパク質修飾である。結果として、cDNAにおける最初のメチオニンは、翻訳開始の部位であると考えられ得る。配列分析はまた、残基215での可能なNGリコシル化部位(分泌標的化シグナルは存在しないが)、ならびに残基50および228(プロテインキナーゼC型)、残基228、250、302、および303(カゼインキナーゼII型)、ならびに残基301(チロシンキナーゼ型)での7つの可能なタンパク質リン酸化部位を明らかにする。

・ビノレシノール/ラリシレシノールポリペプチド鎖の領域(配列番号48)もまた、NADPH結合と関連する保存配列を含むと同定された(Jörnvall, H., Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes (Jeffery, J. 編) 126-148頁, Birkhäuser Verlag, Basel (1980); Branden, C., およびTooze, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991); Wierenga, R.K. ら, J. Mol. Biol. 187:101-108 (1986))。異なるレダクタゼの配列において、限られた数の不変アミノ酸が存在し、これらは、NADPH

H結合部位の指標として観察される。これらは、配列G-X-G-X-X-G(配列番号76)(ここでXは任意の残基)を有する3つの保存されたグリシン残基、および6つの保存された疎水性残基を含む。グリシンリッチ領域は、その正確なコンフォメーションにNADPHを配置することにおける中心的役割を果たすと考えられる。これに関して、(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼのN末端

領域と、*Drosophila melanogaster* アルコールデヒドロゲナーゼ (Branden, C., および Toozee, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991)), *Pinus taeda* 桂皮アルコールデヒドロゲナーゼ (MacKay J.J. ら, Mol. Gen. Genet. 247:537-545 (1995)), ドッグフィッシュ (dogfish) 筋乳酸デヒドロゲナーゼ (Branden, C., および Toozee, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991)), およびヒト赤血球グルタチオンレダクターゼ (Branden, C., および Toozee, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991)) の保存された NAD 結合領域の N 末端領域との比較は、いくつかの興味深い相似物を明らかにした。不変タリシン残基は、ドメインの形成における正確なパッケージングに必要な 6 つの疎水性残基のうちの 4 つであるように、全ての場合にアラニンメントされる。従って、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼ-アインフォームの NADPH 結合部位は、N 末端に近接して局在する。

相同性分析: インフラボンレダクターゼに対する比較。BLAST 検索 (Altschul, S.F. ら, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) を、National Center for Biotechnology Information での非重複性ペプチドデータベースに対して、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼの翻訳されたアミノ酸配列 (配列番号 48) で行った。有意な相同性は、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼについて、マメ科植物 *Cicer arietinum* (Tienann, K., ら, Eur. J. Biochem. 200:751-757 (1991)) (63.5% 類似性, 44.4% 同一性)、*Medicago sativa* (Paiva, N.L. ら, Plant Mol. Biol. 17:653-667 (1991)) (62.6% 類似性, 42.0% 同一性)、および *Pisum sativum* (Paiva, N.L., ら, Arch. Biochem. Biophys. 312:501-510 (1994)) (61.6% 類似性, 41.3% 同一性) からの種々のインフラ

ボンレダクターゼと示された。この観察は、かなり興味深いものである。なぜなら、インフラボノイドは、フェニルプロパノイド-アセチレート経路代謝の関連分岐を介して形成されるからである。詳細には、インフラボンレダクターゼは、イ

ンフラボノイド形成の間、 $\alpha, \beta$ -不飽和ケトンの還元を触媒する。例えば、*Medicago sativa* L.-インフラボンレダクターゼは、フィトアレキシン ((-)-メディカルピン (medicarpin)) の生成において、2'-ヒドロキシ-ホルモノネチン (2'-hydroxy-fomnonen) の (3R)-ベスチトン ((3R)-vestitone) への立体特異的変換を触媒する (Paiva, N.L. ら, Plant Mol. Biol. 17:653-667 (1991))。この配列類似性は、リグナンおよびインフラボノイドの両方が、同程度の植物防御機能および薬理学的役割 (例えば、「植物性発情ホルモン様物質」とともに、一般的なフェニルプロパノイド代謝の派生物であることが、有意に与えられ得る。結果として、両レダクターゼは、非常に類似の反応を触媒するので、インフラボンレダクターゼは、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼから進化したかもしれないと推測する気にさせる。これは、リグナンが、シダ植物、マツモ、裸子植物、および被子植物に存在するので、ありそうなことと考えられる; それゆえ、それらの経路は、明らかにインフラボノイドの前に進化した (Gang, ら, Phytochemicals for Pest Control, Hedinger 編, ACS Symposium Series, Washington D.C., 658:58-59 (1997))。

同程度の相同性もまた、*Arabidopsis thaliana* (Babiychuk, E. ら, EMBL/GenBank/DDBJ データベース (1995) への直接提出 (1995年5月25日)) (65.9% 類似性, 50.8% 同一性)、*Nicotiana tabacum* (Hibi, N. ら, Plant Cell 6:723-735 (1994)) (64.6% 類似性, 47.2% 同一性)、*Solanum tuberosum* (van Eldik, G.J. ら, (1995) EMBL/GenBank/DDBJ データベースへの直接提出 (1995年10月06日)) (65.5% 類似性, 47.7% 同一性)、*Zea mays* (Petrucchio, S. ら, Plant Cell 8:69-80 (1996)) (61.6% 類似性, 44.9% 同一性)、および特に *Lupinus albus* (Attucci, S. ら, 私信および EMBL/GenBank/DDBJ データベース (1996) への直接提出 (06/6/96)) (85.9% 類似性, 66.2% 同一性) からの推定インフラボンレダクターゼ「ホモログ」で観察された。

対照的に、他の NADPH 依存性レダクターゼとの相同性は、有意に低かった: 例

えば、*Petunia hybrida* (Beid, M. ら, Plant Mol. Biol. 13:491-502 (1989)) (43.2% 類似性, 21.5% 同一性) および *Hordeum vulgare* (Kristiansen, K.N. および Ro



hde, W., Mol. Gen. Genet. 230: 49-59 (1991) (46.2%類似性、21.1%同一性) からのジヒドロフラボノールレダクタターゼ、Medicago sativa (Ballance, G.M. および Dixon, R.A., Plant Physiol. 107: 1027-1028 (1995) (39.5%類似性、15.8%同一性) からのカルコンレダクタターゼ、Sesbania rostrata (Goormachtig, S.ら、(1995) 年) BMB/GenBank/DDBJ データベースへの直接提出 (1995年3月13日) (47.6%類似性、24.1%同一性) からのカルコンレダクタターゼ「ホモログ」、Nocardia sp. (Hortsmuichi, S.ら、Appl. Environ. Microbiol. 57: 1386-1393 (1991)) (46.6%類似性、21.0%同一性) からのコレステロールデヒドロゲナーゼ、ならびに Rattus norvegicus (Zhao, H.-F.ら、Journal Endocrinology 127: 3237-3239 (1990) (43.5%類似性、20.6%同一性) からの  $\beta$ -ヒドロキシ-5-エンステロイドデヒドロゲナーゼ。

従って、配列分析は、(+)-ピノシシノール/(+)-ラリシシノールレダクターゼ、イソフラボンレダクターゼ、および推定イソフラボンレダクターゼ「ホモログ」(これは、イソフラボンレダクターゼ活性を有さない)の間の有意な相同性を確認する。

## 实施例14

*Thuja plicata*(-)-ピノール/(-)-ラリシレシノールレダクタ-ゼの

cDNAクローニング

植物材料。西洋赤スギ植物 (*Tuja plicata*) を、ワシントン州立大学温室施設において維持した。

材料。使用したすべての溶媒および化学物質は、試薬またはHPLグレードであった。Taq熱安定性DNAポリメラーゼおよび制限酵素 (SacIおよびXbaI) を、Promegaから入手した。pT7Blue T-ベクターおよびコンピメントなNovaBlue細胞をNovagenから購入し、そして放射性標識化ヌクレオチド ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) をDuPont NENから購入した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および配列決定のためのオリゴヌクレオチドプ

ライマーを、Gibco BRL Life Technologiesによって合成した。GENECLEAN II<sup>®</sup>キット (BIO 101 Inc.) を、PCRアmpliGen<sup>®</sup>の精製のために使用し、ゲル精製し

たDNAの濃度は、1.3%アガロースゲルにおける低DNA質量ラダー (Gibco BRL) と比較することによって決定した。

機器。UV (CO<sub>2</sub>)でのRNAおよびDNA決定を含む) スペクトルを、λ 6 UV/VIS分光光度計にて記録した。Tempronic IIサーモサイクラー (ThermoLyne) を、すべてのPCR増幅のために使用した。配列決定のためのプラスミドDNAの精製は、QIAwells Plusプラスミド精製システム (Qiagen) を使用し、続いてPEG沈殿 (Sambrook, J. & Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻、第3版、Cold Spring

ng Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994) またはWizard®Plus  
SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を行い、DNA配列は、Applie  
d Biosystems Model 373A自動シーケンサーを用いて決定した。

*Thuja plicata* cDNAライブラリー合成-全RNA(6.7  $\mu$ g/新鮮重量)を、Lewinsonらの方法に従って、温室生長西洋赤スギ植物 (*Thuja plicata*) の若緑葉 (葉柄 (stem)を含む) から得た (Lewinson, E.ら, Plant Mol. Biol. Rep. 12:20-25(1994))。 *T. plicata* cDNAライブラリーを、3  $\mu$ gの精製ポリ(A)<sup>+</sup>mRNA(Oligate x-rt<sup>TM</sup> Suspension, Qiagen)を用いて、ZAP-cDNA<sup>TM</sup>合成キット、Uni-ZAP<sup>TM</sup>XRベクター、およびGibco<sup>TM</sup> Cold/Pack<sup>TM</sup> ジンゲン抽出物 (Stratagene) とともに構

築し、一次タイプラリーとして $1.2 \times 10^3$  pfuの力価を得た。増幅したタイプラリー (  $7.1 \times 10^3$  pfu/ml、全量28ml ) を、スクリーニングのために使用した ( Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994) )。

T.plicata(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクタターゼcDNA合成。  
。T.plicata(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクタターゼcDNAを、  
逆転写-ポリメラゼ連鎖反応 (RT-PCR) ストラテジーによってmRNAから得た (Sambrook, J. & Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994))。第1鎖cDNAを、T.plicata cDNAライブラリーの合成のために以前に使用した精製mRNA(上記)から。

合成した。精製 mRNA (150ng) を、ZAP-cDNA<sup>®</sup> 合成キット (Stratagene) からのリ

ンカープライマー (1.4  $\mu$ g) と混合し、10分間70℃に加熱し、そして氷上で素早く冷却した。次いで、変性mRNAテンプレートおよびリンカープライマーの混合物を、First Strand Buffer (Life Technologies)、10mM DTT、0.5mM各dNTP、および200ユニットのSuper Script<sup>TM</sup> II (Life Technologies) と混合し、20  $\mu$ lの最終容量にした。反応を、42℃にて50分間行い、次いで加熱 (70℃、15分) によって停止した。E.coli RNaseH (1.5ユニット、1  $\mu$ l) を溶液に添加し、37℃にて20分間インキュベートした。

次に、第1鎖反応 (2  $\mu$ l) を、100  $\mu$ l PCR反応 (10mM Tris-HCl (pH9.0)、5mM KCl、0.1% TritonX-100、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM各dNTP、および5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ) におけるテンプレートとして、プライマーCR6-NT (5'-GCA CATAAGAGTATCGATAAC3') (配列番号60) およびプライマーXhoI-Poly (d T) (5'-GTCTCGAGTTTTTTTTTTTTT3') (配列番号59) (10pmol) とともに使用した。PCR増幅を、52℃でのアニリング温度を除いて、(Dinkova-Kostova, A.T.ら、J.Biol.Chem. 271:29473-29482(1996)) に記載のようにサーモサイクラーで行った。PCR産物を、1.3%アガロースゲルに溶解し、ここで、予測定 (約1,200bp) を有する少なくとも2つのバンドが観察された。バンドをゲルから抽出した。次いで、ゲル精製したPCR産物 (56ng) を、pT7BlueTベクター (50ng) に連結し、そしてNovagenの説明書に従ってコンピテントなNovaBlue細胞に形質転換した。

挿入したcDNAのサイズおよび方向を、急速煮沸溶解およびPCR技術を用いて、製造業者 (Novagen) の説明書に従って、以下のプライマーの組み合わせで決定した：R20マー (配列番号74) とU19マー (配列番号75)；R20マー (配列番号74) とCR6-NT (配列番号60)；U19マー (配列番号75) とCR6-NT (配列番号60)。挿入したDNAのCR6-NTプライマー末端を、TベクターのU19マープライマー部位の隣に配置した。挿入したcDNAを含むTベクターを、Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep s DNA Purification Systemで精製した。5つの挿入cDNAを、重複配列決定プライマーを用いて完全に配列決定し、そしてポリアデニル化部位が異なることを除いて同一であることを示した。それゆえ、最長のcDNA (p1r-Ip1と命名した) (配列番号61) を、pBluescript発現系を用いて、酵素活性の検出のために使用し

た。

配列分析-DNAおよびアミノ酸配列分析を、UnixベースのGCG Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, 1994年9月、Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711(1996)；Rice, P. Program Manual for the GCG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1Rq, England) およびthe ExpasyWorld Wide Web molecular biology server (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) を用いて行った。

#### 実施例15

Thujia plicata(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼの

#### cDNAクローニングおよび発現

T.plicata(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼのcDNAクローニング。p1r-Ip1をクローン化し、そして配列決定した後、全長クローンを使用して、p1r-Ip1全cDNAインサートをプロンプトとして使用したことを除いて、実施例11に記載のように、T.plicata cDNAライブラリーをスクリーニングした。いくつかのポジティブクローンを配列決定し、1つは新規の唯一のcDNAであることが明らかに、これをp1r-Ip2と命名した。このcDNAは、p1r-Ip1に対する高度な配列類似性 (アミノ酸レベルで約81%類似性) を有するが、以下に記載のように、本来のForsythia intermediaレダクターゼに同一の基質特異性を有するレダクターゼをコードする。

酵素アッセイ。ピノレシノールおよびラリシレシノールレダクターゼ活性を、実施例8に記載のように、以下の改変とともに、[<sup>3</sup>H]ラリシレシノールおよび[<sup>3</sup>H]セコイソラリシレシノールの形成をモニターすることによってアッセイした。簡単に、ピノレシノールレダクターゼ活性についての各アッセイは、(±)-ピノレシノール (MeOH中 5mM, 20  $\mu$ l) および酵素調製物 (すなわち、E.coliからの全タンパク質抽出物、210  $\mu$ l) からなった。酵素反応を、[4R-<sup>3</sup>H]NADPH (10mM, 蒸留H<sub>2</sub>O中 6.79kBq/nmol, 20  $\mu$ l) の添加によって開始した。振盪しながら30℃にて3時間のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、放射性化学キャリアと

して(±)-ラリシレシノール (20 $\mu$ g) および(±)-セコイソラリシレシノール

(20 $\mu$ g) を含むEtOAc (500 $\mu$ l) で抽出した。遠心分離後 (13,800 $\times$ g, 5分)、EtOAc可溶物を取り出し、そして抽出手順を反復した。各アッセイについて、EtOAc可溶物を、液体シンチレーションカウンタを用いるその放射活性の決定のために、取り出したアリコート (100 $\mu$ l) と含わせた。含わせたEtOAc可溶物の残りを吸引して真空中で乾燥し、MeOH/H<sub>2</sub>O(30:70, 100 $\mu$ l)に再構成し、そして逆相およびキラルカラムHPLCに供した。

ラリシレシノールレダクターゼ活性を、(+)-[<sup>3</sup>H]-セコイソラリシレシノールの形成をモニターすることによってアッセイした。これらのアッセイを、上記のように正確に、但し(±)-ラリシレシノール (MeOH中 5mM, 20 $\mu$ l) を基質として使用したことを除いて、放射性化学キャリアとして(±)-セコイソラリシレシノール (20 $\mu$ g) を添加して行った。

E. coliにおけるpIrr-Ip1の発現-pIrr-Ip1のオーブニングフレーム (OR F) がpBluescript SK(-)における $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子 $\alpha$ 相補性粒子とインフレームであるために、pIrr-Ip1を、SacIおよびXbaIでpIrr-Ip1ベクターから切り出し、ゲル精製し、次いでこれらの同じ酵素で消化した発現ベクターに連結した。このプラスミドpPCR-Ip1を、Novagenの説明書にしたがって、NovaBlue細胞に形質転換した。形質転換細胞 (5ml培養物) を、37 $^{\circ}$ Cにて、50 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>カルベニシリンを補充したLB培地 (Sambrook, J.ら, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) 中で、振盪しながら (225rpm)、中期対数期 ( $A_{600}$ =0.5~0.7) まで増殖させた。次に、細胞を、遠心分離 (1000 $\times$ g, 10分) によって回収し、そして10mM IPTG (インゾプロビル $\beta$ -D-チオグルコピラノシド) および50 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>カルベニシリンを補充した新鮮なLB培地に、吸光度0.6 (600nmにおける) まで再懸濁した。細胞 (一晩増殖させた) を遠心分離によって回収し、そして500~700 $\mu$ l (5ml培養管あたり) の緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EDTA, 5mM DTT) に再懸濁した。次に、細胞を超音波処理によって溶解し (5 $\times$ 45秒)、そして遠心分離 (17500 $\times$ g, 4分, 10分) の後、上清を取り出し、そして(-)-ピノレシ

ノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼ活性について、上記のようにアッセイした。コントロールは、インサートDNAを含まないか (ネガティブコントロール

ールとして) または立体特異的コントロールとしてpPLR-F11 (インフレームで真正のF.intemedial(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼのcDNA) を含むpBluescript (SK(-))、ならびに(4R)-H<sub>2</sub>NADPHを除く基質を含まないpPLR-Ip1のアッセイを含んだ。

結果は、(-)-ラリシレシノールおよび(+)-セコイソラリシレシノールの両方が放射性標識され、そして放射性活性の取り込みが(-)-セコイソラリシレシノールでは見いだされないことを示した。しかし、(-)-ラリシレシノールについて観察されたよりもずっと遅い速度ではあるが、(+)-ラリシレシノールへの放射性標識の蓄積もまた観察された。これらの結果は、pIrr-Ip1は、基質として(-)-ピノレシノールおよび(+)-ピノレシノールの両方を使用し得、前者は(-)-ラリシレシノールを介して(+)-セコイソラリシレシノールに完全に変換され、そして後者は、ずっとより遅くに(+)-ラリシレシノールに変換されるが、さらに(-)-セコイソラリシレシノールへは変換されない。

E. coliにおけるpIrr-Ip2の発現。pIrr-Ip2 cDNAは、pBluescript SK(-)における $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 $\alpha$ 相補性粒子とインフレームであることが見いだされた。上記のように、活性および基質特異性について上昇した場合、pIrr-Ip2は、少量の(-)-ラリシレシノールもまた検出されたことを除いて、本来のForsythia aintemedialレダクターゼ (Dinkova-Kostova, A.T., ら, J. Biol. Chem. 271:29473-29482(1996)) と同じ基質特異性および産物形成を有することが見いだされた。これは興味深い、なぜなら、pIrr-Ip2は、Forsythiaレダクターゼに対するよりも、pIrr-Ip1に対して、より高度な配列類似性を有するからである。

全ての上記の観察を、重水素標識化基質(±)-[9,9'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, 10C<sup>13</sup>H<sub>2</sub>]ピノレシノールを用いて、対応するリグナンの単離とともに確認した；次いで、各々を、キラルクロマトグラフィーおよび有PLC質量分析に供して、これらの知見を確認した。

# Thuja plicataおよびTsuga heterophyllaからの

さらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのクロニング

2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、Thuja plicata若い茎のcDNAライブラリーから、実施例15に記載のように、pIr-Tp2のクロニングのために、クロニングした。2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、pIr-Tp3 (配列番号65) およびpIr-Tp4 (配列番号67) と命名した。

2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、Tsuga heterophylla若い茎のcDNAライブラリーから、実施例15に記載のように、pIr-Tp2のクロニングのために、クロニングした。Tsuga heterophyllaからの2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、pIr-Tp3 (配列番号69) およびpIr-Tp4 (配列番号71) と命名した。

本発明の好ましい実施態様が、例示および記載されているが、種々の変更が、本発明の精神および範囲から逸脱せずに本明細書中においてなされ得ることは明らかである。

## 配列表

### (i) 一般的情報:

(i) 出願人: レヴィス, ノーマン ジー  
 デイビン, ローレンス ビー  
 ディンコバー・コストバ, アルベナ ティー  
 フジタ, マサユキ  
 ガン, デイビット アル  
 サルカネン, シモ

(ii) 発明の名称: 組換えポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ, 組換えディリジエントタンパク質, および使用方法

(iii) 配列数: 76

### (iv) 連絡住所:

(A) 名称: クリステンセン, オコノール, ジョンソン アンド  
 カインドネス  
 (B) 番地: フィアス アベニュー 1420, スイート 2800  
 (C) 市: シアトル  
 (D) 州: ワシントン  
 (E) 国: アメリカ合衆国  
 (F) 郵便番号: WA98101-2347

### (v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピー ディスク  
 (B) コンピューター: IBM PC 互換用  
 (C) OS: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) ソフトウェア: バテントイン リリース #1.0, パージョン #1.30

### (vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号:  
 (B) 出願日:  
 (C) 分類:

### (vii) 代理人/事務所情報:

(A) 氏名: シェルトン, デニス ケイ  
 (B) 登録番号: 26,997  
 (C) 照会/記録番号: WSUR111351

### (ix) 電話回線情報:

(A) 電話 : 206 682 8100

(B) テレファックス : 206 224 0779

## (2) 配列番号 1 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 28 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 関連なし
- (ii) 配列の種類 : ペプチド
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (v) フラグメント型 : N-末端
- (vi) 起源 :

(A) 生物名 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質 N 末端配列

## (xi) 配列 : 配列番号 1 :

Lys Pro Arg Pro Xaa Arg Xaa Xaa Lys Lys Glu Leu Val Phe Tyr Phe Xaa  
1 5 15  
Asp Ile Leu Phe Lys Gly Xaa Asn Tyr Asn Xaa Ala  
20 25

## (2) 配列番号 2 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 24 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 関連なし
- (D) トポロジー : 関連なし
- (ii) 配列の種類 : ペプチド
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO

(v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

## (xi) 配列 : 配列番号 2 :

Thr Ala Met Ala Val Pro Phe Asn Tyr Gly Asp Leu Val Val Phe Asp  
1 5 10 15  
Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn  
20

## (2) 配列番号 3 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 16 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 関連なし
- (D) トポロジー : 関連なし
- (ii) 配列の種類 : ペプチド
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

## (xi) 配列 : 配列番号 3 :

Tyr Val Gly Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Leu Xaa Lys  
1 5 10 15

## (2) 配列番号 4 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 関連なし
- (D) トポロジー : 関連なし
- (ii) 配列の種類 : ペプチド
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO

(v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

## (xi) 配列 : 配列番号 4 :

Asp Ile Ser Val Ile Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met Ala Arg  
1 5 10 15

## (2) 配列番号 5 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 関連なし
- (D) トポロジー : 関連なし
- (ii) 配列の種類 : ペプチド
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

## ラグメント

(xi) 配列：配列番号5：

Gly Val Ala Thr Leu Met Thr Asp Ala Phe Gln Gly Asp Xaa Tyr 10  
1 13

(2) 配列番号6の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：10アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：関連なし

(D) トポロジー：関連なし

(ii) 配列の種類：ペプチド

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(v) フラグメント型：Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部ドリブシフ

## ラグメント

(xi) 配列：配列番号6：

Ala Gln Gly Met Tyr Phe Tyr Asp Gln Lys 10  
1 5

(2) 配列番号7の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：5アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：関連なし

(D) トポロジー：関連なし

(ii) 配列の種類：ペプチド

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(v) フラグメント型：Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部ドリブシフ

## ラグメント

(xi) 配列：配列番号7：

Tyr Asn Ala Tyr Leu 5  
1

(2) 配列番号8の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマー-PSINT1」

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号8：

AAGGAGTTC TTTTATTTT Y 21

(2) 配列番号9の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマー-PSIRJ」

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号9：

TATTTCACG GACACGCCAT 20

(2) 配列番号10の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマー-PSIRJ」

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号10：

GTATTCGCT CRTCHAAAC

20

(2)配列番号1.1の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:19塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジ:直鎖状

(ii)配列の種類:他の核酸

(A)記載:PCRプライマー-PS(7R)

(iii)ハイボセティカル:NO

(xi)配列:配列番号1.1:

CONTAAARAA RTGCGCTG

19

(2)配列番号1.2の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:901塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジ:直鎖状

(ii)配列の種類:cDNA

(iii)ハイボセティカル:NO

(iv)アンチセンス:NO

(vi)起源:

(A)生物名:Forsythia intermediaクローンpsd-11

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号:CDS
- (B)存在位置:26..583

(xi)配列:配列番号1.2:

ATTTCGGCAG GAGATTAAAC CAAAC ATG GTT TCT TCT AAA ACA CAA AAT GTA GCT  
Met Val Ser Lys Thr Gln Ile Val Ala  
1 5

52

CTT TTC CTT TGC CTC ACT TCC ACC TCT TCC GGC ACC TAC TAC GGC GGC  
Leu Phe Leu Cys Phe Leu Thr Ser Thr Ser Ala Thr Tyr Gly Arg  
10 15 20 25

100

ARG CCA CGC GCT CGC CGC TCC AAA GAA ATG GTG TTC TAT TTC CAC  
Lys Pro Arg Pro Arg Pro Cys Lys Glu Leu Val Phe Tyr Phe His  
30 35 40

148

GAC GTA CTT TTC AAA GGA AAT AAT TAC CAC AAT GGC ACT TCC GGC ATA  
Asp Val Leu Phe Lys Gly Asn Asn Tyr His Asn Ala Thr Ser His  
45 50 55

195

GTC GGG TCC CCC CAA TGG GGC AAC AAG ACT GGC ATG GGC GTG CCA TTC  
Val Gly Ser Pro Gln Trp Gly Asn Lys Thr Ala Met Ala Val Pro Phe  
60 65 70

244

AAT TAT GGT GAC CTA GTT GTG TTC GAC GAT CCC ATT ACC TTA GAC AAC  
Asn Tyr Gly Asp Leu Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn  
75 80 85

232

AAT CTG CAT TCA CCC CCA GTG GGT GCG GAA GGG ATG TAC TTC TAT  
Asn Leu His Ser Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Met Tyr Phe  
90 95 100 105

340

GAT CAA AAA AAT ACA TAC AAT GCT TCG CTA GGG TTC TCA TTT TTG TTC  
Asp Gln Lys Asn Thr Tyr Asn Ala Trp 110 115 120

388

AAT TCA ACT AAG TAT GTT GGA ACC TTG AAC TTT GCT GGG GGT GAT CCA  
Asn Ser Thr Thr Val Gly Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro  
125 130 135

436

TTG TTG AAC AAG ACT AGA GAC ATA TCA GTC ATG GGT GGA ACT GGT GAC  
Leu Leu Asn Lys Thr Arg Asp Ile Ser Val Ile Gly Thr Thr Gly Asp  
140 145 150

484

TTT TTC ATG GCG AGA GGG GTT GGC ACT TTG ATG ACC GAT GGC TTT GAA  
Phe Phe Met Ala Arg Gly Val Ala Thr Leu Met Thr Asp Ala Phe Glu  
155 160 165

532

GGG GAT GTG TAT TTC CGC CTT GGT GTC GAT ATT AAT TTG TAT GAA TGT  
Gly Asp Val Tyr Phe Asn Leu Arg Val Asp Ile Asn Leu Tyr Glu Cys  
170 175 180 185

580

TGG TAACACATTT AGCGTATAT ATATATATAT ATGCGTATAC ATATTTCTATA  
TTP

633

GATCCAGAT TTCTGTTC AAATCTGCT TCTTTAGTT GTGCCCAAA TAABBBATG

693

TACACATAT TTAATTAATA TAATTTATTA ATGTGTTCAT TTTTGAGTT AAATTTAGT

753

TGTATTTAT TCAATTAATA TAATTTCTCT ATTAATTAATA TAGTCBAGT GACACATAT

813

CAGACACCA TATGTACTTT TATTTCTAT CTTCACACAG TCTCATATG TCAATATAT

873

TGTACTATTG ABBABABAA ABAABAAA

901

(2)配列番号1.3の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:186アミノ酸
- (B)型:アミノ酸
- (D)トポロジ:直鎖状

(ii)配列の種類:タンパク質:Forsythia intermedia PSD-F11タンパク質

(xi)配列:配列番号1.3:

Met Val Ser Lys Thr Gln Ile Val Ala Leu Phe Leu Cys Phe Leu Thr  
1 10  
Ser Thr Ser Ser Ala Thr Tyr Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Arg Pro  
20 25 30  
Cys Lys Gln Leu Val Phe Tyr Phe His Asp Val Leu Phe Lys Gly Asn  
35 40 45  
Asn Tyr His Asn Ala Thr Ser Ala Ile Val Gly Ser Pro Gln Trp Gly  
50 55 60  
Asn Lys Thr Ala Met Ala Val Pro Phe Asn Tyr Gly Asp Leu Val Val  
65 70 75 80  
Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val  
85 90 95  
Gly Arg Ala Gln Gly Met Tyr Phe Tyr Asp Gln Lys Asn Thr Tyr Asn  
100 105 110  
Ala Trp Leu Gly Phe Ser Phe Leu Phe Asn Ser Thr Lys Tyr Val Gly  
115 120 125  
Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Leu Lys Thr Arg Asp  
130 135 140  
Ile Ser Val Ile Gly Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met Ala Arg Gly Val  
145 150 155  
Ala Thr Leu Met Thr Asp Ala Phe Gln Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu  
160 165 170 175  
Arg Val Asp Ile Asn Leu Tyr Gln Cys Trp Asn Ser Thr Lys Thr Val  
180 185

## (2) 配列番号14の情報:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 888塩基対
- (B) 型: 核酸塩基配列
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PSD-F12

(iii) ハイボセディカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 19..573

(xi) 配列: 配列番号14:

ANTTGGCAC CAGGAAA ATG GCA GCT AAA ACA CAA ACC ACA GCC CTT TTC  
Met Ala Ala Lys Thr Gln Thr Thr Ala Leu Phe  
190  
CTC TGC CTC CTC ATC TGC ATC TGC GCG GTG TAC GGC CAC CAA ACC AGG  
Leu Cys Leu Leu Ile Cys Ile Ser Ala Val Tyr Gly His Lys Thr Arg  
200 205 210  
TCT GCA GCG CCC TGT NAA GAG CTC GTT TTC TTC CAC GAC ATC CTC  
Ser Arg Arg Pro Cys Lys Gln Leu Val Phe Phe His Asp Ile Leu  
215 220 225  
TAC CTA GGA TAC AAT AGA AAC AAT GCG ACC GCT GTC ATA GTA GCC TCT  
Tyr Leu Gly Tyr Asn 235  
230 240 245  
CCT CAA TGG GGA AAC AAG ACT GCG ATG GCT AAA CCT TTC AAT TTT GGT  
Pro Gln Trp Gly Asn Lys Thr Ala Met Ala Lys Pro Phe Asn Phe Gly  
250 255 260  
GAT TTG GTT GTG TTT GAT GAT CCC ATT ACC TTA GAC AAC AAC CTG CAT  
Asp Leu Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Leu His  
265 270 275  
TCT CCT CCG GTC GCG CGG GCT CAG GGA ACT TAT TTC TAC GAT CAA TGG  
Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Thr Tyr Phe Thr Asp Gln Trp  
280 285 290 295  
AGT AAT TAT GGT GCA TGG CTT GCA TTT TCA TTT TTG TTC AAT TCT ACT  
Ser Ile Tyr Gly Ala Trp Leu Gly Phe Ser Phe Leu Phe Asn Ser Thr  
300 305 310  
GAT TAT GTT GGA ACT CTA AAT TTT GCT GGA GCT GAT CCA TTG ATT AAC  
Asp Tyr Val Gly Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Ile Asn  
315 320 325  
AAA ACT AGG CAC ATT TCA GTA ATT GGA GGA ACT GGT GAT TTT TTC ATG  
Lys Thr Arg Asp Ile Ser Val Ile Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met  
330 335 340  
GCT AGA GGG GTA GCG ACT GTG TCG ACC GAT GCT TTT GAA GGG GAT GTT  
Ala Arg Gly Val Ala Thr Val Ser Thr Asp Ala Phe Gln Gly Asp Val  
345 350 355  
TAT TTC AGG CTT CTT GAT ATT AGC TTG TAT GAG TGT TGG  
Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asp Ile Arg Leu Tyr Gln Cys Trp  
360 365 370  
TAATTTAC TTATTTTC ATTTTCTCA GTTTCACG CATTGACTA ATATGCTTT  
633  
CTGTAACCT TGTATTGAT CAATTGAG CGATTATAC AATTAGTAT TGTTCGTTT  
693  
AATTTTAA CTGTAAAA AATTTGTGT CAAAAGCCTA TAACCAAC CTGAGGAGT  
753  
TTTTTCGT AAGGCGAAA AAAAGTAGT CCAAGGTA CTACGTTTC AATTCAATC  
813  
AATTTGCT TTTCATCAT CTCTCTAAA AAAAATAAAA AAAAA

## (2) 配列番号15の情報:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 185アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状



## (i) 配列の種類: Forsythia intermedia 指標タンパク質PSD-F12

## (xi) 配列: 配列番号15:

Met Ala Ala Lys Thr Gln Thr Thr Ala Leu Phe Leu Cys Leu Leu Ile  
1 5 10 15  
Cys Ile Ser Ala Val Tyr Gly His Lys Thr Arg Ser Arg Arg Pro Cys  
20 25 30  
Lys Glu Leu Val Phe Phe His Asp Ile Leu Tyr Leu Gly Tyr Asn  
35 40 45  
Arg Asn Asn Ala Thr Ala Val Ile Val Ala Ser Pro Gln Trp Gly Asn  
50 55 60  
Lys Thr Ala Met Ala Lys Pro Phe Asn Phe Gly Asp Leu Val Val Phe  
65 70 75 80  
Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val Gly  
85 90 95  
Arg Ala Gln Gly Thr Tyr Phe Tyr Asp Gln Trp Ser Ile Tyr Gly Ala  
100 105 110  
Trp Leu Gly Phe Ser Phe Leu Phe Asn Ser Thr Asp Tyr Val Gly Thr  
115 120 125  
Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Ile Asn Lys Thr Arg Asp Ile  
130 135 140  
Ser Val Ile Gly Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met Ala Arg Gly Val Ala  
145 150 155 160  
Thr Val Ser Thr Asp Ala Phe Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg  
165 170 175  
Val Asp Ile Arg Leu Tyr Glu Cys Trp  
180 185

## (2) 配列番号16の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 948塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 型の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: Tsuga heterophylla 指標タンパク質cDNA PSD-Th1

## (iii) ハイボテディカル: NO

## (iv) アンチセンス: NO

## (i) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 104..688

## (xi) 配列: 配列番号16:

GGGCAACCTC TCTCTTAAAT TGACGCGCTC TCTCTTAACT TCTCTTGTAA GTTCTTGAT  
60  
CCCAATATCT CTCTTAAAT CACTTACTGC TATAGNATG TCA ATG GCA ATC AAG  
115 Met Ala Ile Lys  
AAT CQT AAT AGA GCT GTG CAC TTG TGT TTT CTA TGS CTT CTA CTG TCC  
163  
Asn Arg Asn Arg Ala Val His Leu Cys Phe Leu Trp Leu Leu Ser  
190 195 200 205  
TCT GTG TTG CAA ACA AGT GAT GGG AAA AGC TGG AAG AAG CAC CGA  
211  
Ser Val Leu Leu Gln Thr Ser Asp Gly Lys Ser Trp Lys Lys Arg  
215 220  
CTC CCA AAG CQT TGT AGG AAT CTG TTG TAT TTC CAT GAT GAT GAT ATC  
259  
Leu Arg Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Val Ile  
225 230 235  
TAC AAT GCC AGC AAC GCC AAG AAC CQT ACA TCC ACA CTT GTG CQT GCT  
307  
Tyr Asn Gly Ser Asn Ala Lys Asn Ala Thr Ser Thr 240 245 250  
CCC CAC GGG TCT AAC CTC ACA CTT CTC GCT GCA AAA GAC AAC CAC TTT  
355  
Pro His Gly Ser Asn Leu Thr Leu Leu Ala Gly Lys Asp Asn His Phe  
255 260 265  
GCA CAT CTG GCG CTG TTT CAC GAT CCG ATC ACT CTT GAC AAC AAT TTC  
403  
Gly Asp Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Phe  
270 275 280  
CAC TCT CQT CCG GTG GCG ACA GCT CAG GCA TTC TAC TAT TAT CAC ATC  
451  
His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln 285 290 295  
AAG AAC ACC TTC AGC TCC TGG CTT GGA TTC AGC TTT GTA CTC AAC TCT  
499  
Lys Asn Thr Phe Ser Ser Trp Leu 300 305 310  
ACA GAT TAC AAA GGC ACC ATC AGC TTC TCT GCA GCC GAT CCA AAC CTT  
547  
Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Ser Gly Ala Asn Pro Ile Leu  
310 315 320 325 330  
ACT AAA TAC AGA GAT ATA TCA GTG GTG GGA GCA ACT GCA GAT TTC ATA  
595  
Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Ile  
335 340 345  
ATG GCA AGA GGA ATC GGC ACA ATC TCC ACC GAT GCG TAT GAA GGC CAC  
613  
Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp  
350 355 360 365  
GTT TAC TTC CQT CTC TGC GTG AAT ATC ACA CTC TAT CAC TGC TAC  
688  
Val Tyr Phe Arg Leu Cys Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr  
370 375 380  
TGAGTCTAT AGTGTATTT TCTCTTCTCA CTATCTATTT ATATCTTCAI TTAGTGTAA  
748  
CTATGTTTT CTGTGGCAG NGATATGCA GAACTCTGA GATATGTAG CGTGAATTC  
808  
CTTTACGACG CCAATATGT ATTTGATTT TGTGAGGCG CAACTCAAT ATGTGCAAG  
868  
GAAATCCAG ATTTCTATGT CGGTCAACA CTTTATTTA AAATATTAAG AAATTTGCT  
928  
TAAAAAAA AAAAAAAA  
948

## (2) 配列番号17の情報:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 195アミノ酸  
(B) 型: アミノ酸

## (D) トポロジー: 直鎖状

## (11) 配列の種類: Tsuga heterophylla 指標タンパク質PSD-Th1

## (11) 配列: 配列番号17:

Met Ala Ile Lys Asn Arg Asn Arg Ala Val His Leu Cys Phe Leu Trp  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Ser Val Leu Leu Gln Thr Ser Asp Gly Lys Ser Trp  
20 25 30

Lys Lys His Arg Leu Arg Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Phe  
35 40 45

His Asp Val Ile Tyr Asn Gly Ser Asn Ala Lys Asn Ala Thr Ser Thr  
50 55 60

Leu Val Gly Ala Pro His Gly Ser Asn Leu Thr Leu Leu Ala Gly Lys  
65 70 75 80

Asp Asn His Phe Gly Asp Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu  
85 90 95

Asp Asn Asn Phe His Ser Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr  
100 105 110

Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ser Trp Leu Gly Phe Thr Phe  
115 120 125

Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Ser Gly Ala  
130 135 140

Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr  
145 150 155 160

Gly Asp Phe Ile Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala  
165 170 175

Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Cys Val Asn Ile Thr Leu Tyr  
180 185 190

Glu Cys Tyr  
195

## (2) 配列番号18の情報:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 840塩基対  
(B) 型: 核糖  
(C) 鎖の数: 一本鎖

## (D) トポロジー: 直鎖状

## (11) 配列の種類: Tsuga heterophylla 指標タンパク質PSD-Th2 cDNA

## (111) ハイボセティカル: NO

## (112) アンチセンス: NO

## (12) 配列の特徴:

## (A) 特徴を表す記号: CDS

## (B) 存在位置: 71..625

## (11) 配列: 配列番号18:

GTCTGTCCTC AATCTCTCAT TAGCTTCCA TCTATCTCAG GATCCCATCT TCTCTCTTC  
60

AAGATTGCGA ATG GCT ATC ANG AGT AAT NGG GCT GTC GCT TTC TCC TTT  
109 Met Ala Ile Lys Ser Asn Arg Ala Val Arg Phe Cys Phe

GTA TGG CTT CTG TTG TTG CAA AGT GGT TTT GTA TTT CCA CTC CCA CAG  
157 Val Trp Leu Leu Leu Leu Leu Val Phe Val Pro Leu Pro Gln

CCT TGT AGG AAT CTG GTT TTG TAT TTC CAC GAT GTA CTC TAC AAT GGC  
205 P20 Cys Arg Asn Leu Val Val Leu Tyr Phe His Asp Val Leu Tyr Asn Gly

TTC AAC GCC CAC AAC GCT ACA TCT ACA CTT CTG GGT GCT CCA CAG GGG  
253 Phe Asn Ala His Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val Gly Ala Pro Gln Gly

GCT AAC CTC ACA CTT CTC GCT GCA AAA CAC AAC CAC TTT GGA GAT CTG  
301 Ala Asn Leu Thr Leu Leu Leu Ala Gly Lys Asp Asn His Phe Gly Asp Leu

CGC CTG TTC GAC GAT CCG ATC ACT GCT GTC GAC AAC AAT TTC CAG TCT CTT  
349 Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn 285

CCG CTG GCC AGA GCT CAG GGA TTC TAC TTT TAT GAC ATG AGC AAC AGC  
397 Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr

TTC ACC TCC TGG CTT GGA TTC GCG TTT GTA CTC AAC TCT ACA GAT TAC  
445 Phe Ser Ser Trp Leu Leu 310 315

AAA GGC ACC ATC GCG TTC TCT GGA GCG GAT CCA ATC GCT ACT AAA TAC  
493 Lys Gly Thr Ile 325 330

AGA GAT ATA TCA GTG GTG GGA GGA ACT GGA GAT TTC ATA ATG GCA AGA  
541 Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Thr Gly Asp Phe Ile Met Ala Arg

GGA ATC GCG ACA ATC TCC ACC GAT CCG TAT GAA GGA GAT GTT TAC TTC  
589 Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe

GCT CTC GCG CTC AAT ATC ACA CTC TAT GAA TGC TAC TGTATATAT  
635 Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr

ARGAGCTAC TGTTCCTCT CTGGTCTCC CATTTCGATG CTCYTTTAA CATTAGCTCT 595  
 TTCATTAAT TGTGTAGCC TCTCATPAA ACCAGTAA ATATTCTTC TGTATTATA 755  
 GCAGCTCCA AATCATGTA TTGATATTT ATATTATTG CATTATAC ANGTCCATA 815  
 AATATTCTT CAGCTAATAA AAAA 849

(B)型：核酸  
 (C)鎖の数：一本鎖  
 (D)トポロジ：直鎖状  
 (ii)配列の種類：Thulja plicata指揮タンパク質PSD-TpI CDNA  
 (iii)ハイボセデンス：NO  
 (iv)アンチセンス：NO  
 (ix)配列の特徴：

## (2)配列番号19の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：185アミノ酸  
 (B)型：アミノ酸  
 (D)トポロジ：直鎖状

(ii)配列の種類：PSD-Th7から翻訳されたTsuga heterophylla指揮タンパク質

(xi)配列：配列番号19：

Met Ala Ile Lys Ser Asn Arg Ala Val Arg Phe Cys Phe Val Trp Leu 1  
 5 10 15  
 Leu Leu Leu Gln Ser Gly Phe Val Phe Pro Leu Pro Gln Pro Cys Arg 20  
 25 30  
 Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Val Leu Tyr Asn Gly Phe Asn Ala 35  
 40 45  
 His Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val Gly Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu 50  
 55 60  
 Thr Leu Leu Ala Gly Lys Asp Asn His Phe Gly Asp Leu Ala Val Phe 65  
 70 75 80  
 Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Phe Gln Ser Pro Pro Val Gly 85  
 90 95  
 Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ser 100  
 105 110  
 Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr 115  
 120 125  
 Ile Thr Phe Ser Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Thr Tyr Arg Asp Ile 130  
 135 140  
 Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Ile Met Ala Arg Gly Ile Ala 145  
 150 155 160  
 Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg 165  
 170 175  
 Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180  
 185

## (2)配列番号20の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：873塩基対

(ii)配列：配列番号20：

GTTCACACAG CGATTTCAG AGAT ATG AGT AGA ATA GCA TTT CAT TTG TGC 51  
 Met Ser Arg Ile Ala Phe His Leu Cys 190  
 TTC ARG GGG CTT CTG CTC TCT TCC ACG GTG CTC AGA AAT GTA CAT GGG 99  
 Phe Met Gly Leu Leu Ser Ser Thr Val Val Arg Asn Val Asp Gly 200  
 205 210  
 CAT GCA TGG AAG AGG CAA CTT CCA ATG CCA TCT AAG AAT TTG CTC CTC 147  
 His Ala Trp Lys Arg Gln Leu Pro Met Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu 215  
 220 225  
 TAC TTT CAT CAT ATA CTC TAC AAT GGC AAA AAC ATT CAC AAT GCA ACT 193  
 Tyr Phe His Asp Ile Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Ile His Asn Ala Thr 230  
 235 240  
 CCT GCG CTG GTT GCA CCT CTT CCG TGG GGC AAT CTC ACT ACT TTC GCT 213  
 Ala Ala Leu Val Ala Ala Pro Ala Trp Gly Asn Leu Thr Thr Phe Ala 245  
 250 255  
 CAA CCT TTC AAG TTT GGA CAT GTG CTT GTG TTT GAC CAT GCG AAT ACT 291  
 Gln Pro Phe Lys Phe Gly Asp Val Val Val Phe 260 265 270  
 CTC GAC AAC AAT CTT CAC TCT CTT CTT GTG GGA AGA GCG CAG GGA TTT 339  
 Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val Gln Arg Ala Gln Gly Phe 275  
 280 285 290  
 TAT TTG TAC AAC ATG AAG ACT ACT TAC AAT GCT TGG TTG GGG TTC ACA 387  
 Tyr Leu Tyr Asn 295 300 305  
 TTT CTG CTG AAT TCG ACA CAT TAT AAG GCG ACA ATC ACC TTC AAT GGC 435  
 Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly 310  
 315 320 325  
 GCG GAC CCC CCG CTC CTT BAC TAC AGA CAT ATA TCC GTT GTT GCG GGT 483  
 Ala Asp Pro Pro Leu Val Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly 325 330 335  
 ACG GGT GAT TTC TTG ATG GCG AGA ATT GCG ACC-CTT TCT ACT GAT 531  
 Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Leu Ser Thr Asp 340  
 345 350  
 GCA ATC GAG GGA AAT CTT TAT TTC CCA CTC ACC CTT AAC ATC ACA CTC 579  
 Ala Ile Glu Gly Asn 355 360 365 370

TAC GAG TGT TAC TGAATATAC TACATATAC GAGAGTCTTT GTTAGAGA 631  
Tyr Glu Cys Tyr

TAGTGTGTG GCGTCTTAC TTAGATGCA GCTTCAGC ACTGAGCTC TTGTTTAGA 691

TGATGCCAT GGTGGCTTTT CTTTCCTGT GAGGTATAC ATCACTCTC ACCAGTCTTA 751

CTGATATG TTAGATATT GAGAGTCTT GTAGTTCAG TATATGCTT TTGGCTGTT 811

TTTTCCTGT CGAATATTA AAAAAAATA AAAAAAATA AAAAAAATA 871

AA 873

(2) 配列番号 21 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 189 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 21:

Met Ser Arg Ile Ala Phe His Leu Cys Phe Met Gly Leu Leu Ser 1  
Ser Thr Val Leu Arg Asn Val Asp Gly His Ala Trp Lys Arg Glu Leu 20  
Pro Met Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Leu Tyr 35  
Asn Gly Lys Asn Ile His Asn Ala Thr Ala Leu Val Ala Ala Pro 40  
Ala Trp Gly Asn Leu Thr Thr Phe Ala Glu Pro Phe Lys Phe Gly Asp 45  
Val Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser 50  
Pro Pro Val Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr Leu Tyr Asn Met Lys Thr 55  
Thr Tyr Asn Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp 60  
Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Pro Leu Val Lys 65

Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala 145  
Arg Gly Ile Ala Thr Leu Ser Thr Asp Ala Ile Glu Gly Asn Val Tyr 150

Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 155  
160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

ACA TTT GTG TTG AAT TCA ACA AAT TAT AAG GGC ACC ATC ACC TTC AAT 496  
 Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asn Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn 325  
 GGG GGT GAC CCA AAT CTG ACT AAG TAC AGA GAT ATA TCT GTT GTG GGT 544  
 Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly 340  
 GGT ACG GGT GAT TTC TTG ATG GCC AGA GGA ATC GCC ACC AAT TCT ACT 592  
 Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr 345  
 GAT GCA TAC GAG GGA GAT GTT TAT TTC CGT CTT AGG GTG AAT ATC ACT 640  
 Asp Ala Tyr Glu Gly Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr 365  
 CTC TAT GAG TGT TAC TGAATCGAAT TTGATTCCT GTTCTAATCT CTATATTGAG 695  
 Leu Tyr Glu Cys Tyr 380

AGCATGACCA TTCATTAAC TTATAGAG CATAATPAA TAGTGCGAGG AATATAGAG 755  
 GTAAGGATG AGATATATTC AGCCTCAAT CTATATCTGC ATGACTTTG TATGTCAT 815  
 TGTITTAATA AATTGACCA GTTTCATCAT GTTCAGAAA AAAAAAAAAA AA 867

## (2) 配列番号 23 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 192 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 型の数: 直鎖状
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (E) 配列の種類: タンパク質

(ii) 配列: 配列番号 23:

Met Ala Met Lys Ala Ala Lys Phe Leu His Phe Leu Phe Ile Trp Leu 1  
 5 10 15  
 Leu Val Cys Thr Val Leu Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Arg Trp Lys 20  
 25 30  
 Lys Lys Ile Pro Glu Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 35  
 40 45  
 Ile Leu Tyr Asn Gly Ser Asn Lys His Asn Ala Thr Ser Ala Ile Val 50  
 55 60  
 Gly Ala Pro Lys Gly Ala Asn Leu Thr Ile Leu Thr Gly Asn Asn His 65  
 70 75  
 Phe Gly Asp Val Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn 80  
 85 90 95  
 Leu His Ser Thr Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 100  
 105 110  
 Met Lys Asn Thr Phe Asn Ser Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 115  
 120 125

Ser Thr Asn Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile 130  
 135 140  
 Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe 145  
 150 155  
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly 160  
 165 170 175  
 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180  
 185 190

## (2) 配列番号 24 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 914塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 型の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (E) 配列の種類: Thnja plicatata指揮タンパク質PSD-1p3 cDNA
- (F) ハイボセディカル: NO
- (G) アンチセンス: NO
- (H) 配列の特徴:
- (I) 特徴を表す記号: CDS
- (J) 存在位置: 94..669

(ii) 配列: 配列番号 24:

CCTAGCAAT ATCTGAGG GAGCGGAAA TTGAGATAT TGTGTGCA AATATPZAAA 60  
 AGATTAGATT CAGGCAATT TCCAGATGT GTT GTA TCT AAA ACA GCT GCT ACA 114  
 Val Ser Lys Thr Ala Ala Arg 119  
 GTT CTG CAT TTA TCG TTT CTA TGG CTT CTA GTA TCT GCA ATC TTC ATA 162  
 Val Leu His Leu Cys Phe Leu Trp Leu Leu Val Ser Ala Ile Phe Ile 200  
 205 210 215  
 AAA TCT CCA GAT TCG CGT AGC TCG AAA AAG AAC GAT CTT CCA AAG CCG TGT 210  
 Lys Ser Ala Asp Cys Arg Ser Trp Lys Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys 220  
 225 230  
 ACA AAT CTT TGG TTA TAT TTT CTT GAT ATA ATC TAC AAT GGC AAA AAT 258  
 Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Lys Asn 240  
 245 250  
 GCA GAG AAT GCA ACA TCT GCA CTT GTT TCA GCG CTT CAA GGA GGT AAT 306  
 Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Pro Glu Gly Ala Asn 255  
 260 265

CTC ACC ATT ATC ACT GGT TAT AAC CAT TTT GGG AAT CTT GCA GTG TTT 354  
 Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Leu Ala Val Phe 265  
 270  
 GAT GAT CTT ATT ACT CTT GAC AAC AAT CTT CAC TGT CCG CTT CTT GCA 402  
 Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val Gly 285  
 285  
 AGA GCT CAG GGC TTT TAC TTC TAT GAC AAG AAG ACC TTC ACT GCC 450  
 Arg Ala Gln Gly Phe Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala 300  
 305  
 TGG CTT GGC TTC ACA TTT GTG CTC TAT TCA ACT GAT CAC AAG GGC TCC 498  
 Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys Gly Ser 315  
 320  
 ATT ACT TTC AAT GGA GCA GAT CCC ATC TTA ACA AAG TAC AAG GGC ATA 546  
 Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile 330  
 335  
 TCT GTT GTG GGT GGA ACA GGG GAT TTC TTG ATG GCA AGA GGA ATT GCT 594  
 Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala 345  
 350  
 ACC ATT TCT ACT GAC TCA TAT CAG GCA GAT GTT TAT TTC AGG CTT AGC 642  
 Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg 360  
 365  
 GTC AAT ATC ACA CTC TAT GAC TGT TAC TCA CAAATT CTTCTCTG 689  
 Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 380  
 385  
 TATTCTGAT TTTGGGACC TTTAAGAT AGTGTTCAC TTCANGTCT CTATAGTAA 749  
 TACACTGTC TGAGATTAT ATACGATGA CTATAGAAC TATGTTGAAT TCTGTTCTGT 809  
 AGCTAATTA TGTATATGAT CACATCAAT CTCTAATAT GATACGATT TGTATATAC 869  
 CCAGATBAG TATGCTATCT GCTTTCACAA AAAAAAATA AAAA 914

## (2) 配列番号 25 の情報:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 192アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

## (x1) 配列: 配列番号 25

Val Ser Lys Thr Ala Ala Arg Val Leu Leu Cys Phe Leu Trp Leu 1  
 Leu Val Ser Ala Ile Phe Ile Lys Ser Ala Asp Cys Arg Ser Trp Lys 20  
 25  
 Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 35  
 40  
 Ile Ile Tyr Asn Gly Lys Asn Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val 50  
 55  
 Ser Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His 65  
 70  
 75

Phe Gly Asn Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn 95  
 100  
 Leu His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 110  
 115  
 Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 120  
 125  
 Ser Thr Asp His Lys Gly Ser Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile 130  
 135  
 Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe 145  
 150  
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly 155  
 160  
 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195

## (2) 配列番号 26 の情報:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 704塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 数の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: Thella plicata 指押タンパク質 PSD-Tp4 cDNA

(12) ハイボセデインカル: NO

(13) アンチセンス: NO

## (14) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 3..416

## (x1) 配列: 配列番号 26

AG AAT CCC CAC AAT GCA ACA TCT GCA CTT GCT GCA GCT GCT GAG GGA 47  
 Asn Ala His Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Ala Pro Glu Gly 195  
 200  
 GCC AAT CTC ACC AAT AAG ACT GGT AAT AAC CTT TTT GCG AAT AAT GCT 95  
 Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Ile Ala 210  
 215  
 GTG TTT GAT GAT GAT CTT AAT ACT CTT GAC AAC AAT CTT CAC TCT TCT 143  
 Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Ser 220  
 225  
 GTT GGA ACA GCT CAG GGC TTT TAC TTC TAT GAC ATG AAG GAT ACC TTC 191  
 Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asp Thr 230  
 235  
 AAT GCT TGG CTT GGT TTT ACA TTT GTC CTC AAT TCA ACT GAT CAC AAG 239  
 Asn Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys 240  
 245  
 250  
 255  
 260  
 265  
 270

GGC ACC ATT ACT TTC TAT GGA GCA GAT CCA ATC CTG ACC AAG TAC AGA 287  
Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg 285  
275  
GAT ATA TCT GTT GGT GGA ACA GGG GAT TTC TTG ATG GCC AGA GGA 335  
Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly 290  
295  
ATT GCC ACC ATT TCT ACT GAT TCA TAT GAG GGA GAT GTT TAT TTC AGG 363  
Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg 310  
315  
CTT AGG GTC AAT ATC ACA CTC TAT GAG TCT TAC TAAATAGAA TTTCCTCTGT 436  
Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 320  
325  
ATTACTAGCT TATGAGAGTC ATTCCCTGGT TCATGCTCA GGGCTGCGA TAAAGCAATT 496  
TGAGATGGT TTTCATATAT GSAGCATGTA TTCTAATTTG AAGAGCCCTC AGCGAGTGC 556  
ATTITACGGA GTTATGTTT GCCCTCAGC ATATATNGTT TTCAATATCC TCTATCAAG 616  
TCATATGATG TATGAGAGTAC CATTTGGAT AATTAGGCA ASCTATTTT ATTAABAAA 676  
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA 704

Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu 125  
115  
Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 130  
135

(2) 配列番号28の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 820塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: Thuja plicata指標タンパク質PSD-Tp5 cDNA

(111) ハイボセティカル: NO

(112) アンチセンス: NO

(12) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 43..612

(x1) 配列: 配列番号28:

GTCTAATGCA GAGGAAATTC CATTATTTT TTACCAATG CA ATG AAA GCC ATT 54  
Met Lys Ala Ile 110  
AGA GTT CTG CAT TTA TGC TTT CTA TGT CTT CTA GTS TCT GCA ATC TTG 102  
Arg Val Leu His Leu Cys Phe Leu Cys Leu Val Ser Ala Ile Leu 145  
150  
CTA AAA TCT GCA GAT TGC CAT AGC TGG AAA ANG ANG CTT CCA ANG CCC 150  
Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Ser Trp Lys Lys Leu Pro Lys Pro 160  
165  
TGC AAG AAT CTT GTG TTA TAT TTC CAT GAT ATA ATC TAC AAT GGC AAA 198  
Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Lys 175  
180  
AAT GCA GAG AAT GCA ACA TCT GCA CTT GTT GCA GGC CTT GAG GGA GCC 246  
Asn Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Pro Glu Gly Ala 200  
205  
AAT CTC ACC ATT ATG ACT GGT AAT AAC CAT TTT GGG AAT CTT GCT GTG 294  
Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Leu Ala Val 210  
215  
TTT GAT GAT CTT ATT ACT CTT GAC AAC AAT CTC CAC TCT CTT CTT GTG 342  
Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val 225  
230  
GCA ACA CTT CAG GGA TTT TAC TTC TAT GAC ATG AAG AAC ACC TTC AGT 390  
Gly Arg Ala Glu Gly Phe Thr Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser 245  
250  
GCT TGC CTT GGC TTC ACA TTT GTG ATG AAT TCA ACT GAT CAC AAG GGC 438  
Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys Gly 255  
260

(2) 配列番号27の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 138アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(x1) 配列: 配列番号27:

Asn Ala His Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Pro Glu Gly Ala 15  
1 5 10  
Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn His Phe Gly Asn Ile Ala Val 30  
20 25  
Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Ser Val 45  
35 40  
Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asp Thr Phe Asn 60  
50 55  
Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys Gly 80  
65 70  
Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp 95  
85 90  
Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile 110  
100 105





CTG TTT GAT GAT CTT ACT CTT GAC AAC AAT CTC CAC TCT CTT CTT  
Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro  
285

CTG GGA AGA GCT CAG GGC TTT TAC TTC TAT GAC ATG AGC AAC ACC TTC  
Val Gly Arg Ala Gln Gly Asp Met Lys Asn Thr Phe  
290

ACT GCT TGG CTT GGC TTC ACA TTT GTG CTG AAT TCA ACT GAT CAC AAG  
Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val 315

GGC ACC AAT ACT TCT AAT GGA GCA CCA ATC CTC ACC AAG TAC AGA  
Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Arg  
325

GAT ATA TCT GTT GGT GGA ACA GGG GAT TTC TTG ATG GCC AGA GGA  
Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly  
340

AAT GCC ACC AAT TCT ACT GAT TCA TAT GAG GCA GAT GTT TAT TTC AGG  
Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg  
355

CTT AGC GTC AAT AAT ACA CTC TAT AAG TCT TAC TGACCAATG CTTGCTTCT  
Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Lys Cys Tyr  
375

TCTCTGTAG TTTTGTTT GGTGCTTTC GAGGATAGT TCTTGCTTC AATGCTCTG  
TATGTGTAA CAGTGTCAT GAGCTCAT TTAGATATA TGACATATA GTCTCTAT  
ATAATATAT TGAAGAGAT GAGATCTGTT TTAGTAGCT CTTTCATTC AATAATAGG  
GTTACTTGC ATTCACTT TCTTCAAG ATCACTTATG GAGCATTTCC TTTTACTCT  
TTTATGGAT TTTTGACATA TTAGATCT TCTCTCAA ATATATCTTA AATCAGTTAT  
ATATCAACT ATATATAT AAGTTCAGAA ATATCAGAAC AACCATTTTA TGGAAAAA  
AAAAAAAAA AAAAAA

(2) 配列番号 31 の情報:  
(i) 配列の特徴:  
(A) 長さ: 180 アミノ酸  
(B) 型: アミノ酸  
(C) トポロジー: 直鎖状  
(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 31:  
Met Lys Ala Ile Arg Val Leu Gln Leu Cys Phe Leu Trp Leu Leu Val  
1 5 10 15  
Ser Ala Ile Leu Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Ser Trp Lys Lys  
20 25 30  
Leu Pro Lys Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile  
35 40 45  
Tyr Asn Gly Lys Asn Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Ala  
50 55 60

Pro Glu Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Thr Gly Asn Asn His Phe Gly  
85 90 95  
Asn Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His  
95 100 105  
Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys  
110 115 120  
Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr  
125 130 135  
Asp His Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr  
140 145 150  
Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met  
155 160 165  
Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val  
170 175 180  
Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Lys Cys Tyr  
185 190 195

(2) 配列番号 32 の情報:  
(i) 配列の特徴:  
(A) 長さ: 913 塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖状  
(ii) 配列の種類: Thupa plicata 指揮タンパク質 PSD-Tp7 cDNA  
(iii) ハイボセディカル: NO  
(iv) アンチセンス: NO  
(x) 配列の特徴:  
(A) 特徴を表す記号: CDS  
(B) 存在位置: 71..652

(xi) 配列: 配列番号 32:  
GCACCTCAG ATACCCGACT TCTTCTCTA CTCAGAGCT CTTCTTCTT CACACATTTT 60  
TGAATATTT TGCACA ATG GCA ATC TGG AAT GGA AGA GTT CTG AAT TTC 109  
Met Ala Ile Trp Asn Gly Arg Val Leu Asn Leu 200  
TGC AAT CTG TGG CTT CTG CTC TCC AAT GTT TTG CTG AAT GGT ATA GAT 157  
Cys Ile Leu Trp Leu Leu Val Ser Ile Val Leu Leu Asn Gly Ile Asp 210  
TGC CAT ACT AGA AHA AAG AAG CTT CCA AAG CCA TGT AGG AAT CTT GTT 205  
Cys His Ser Arg Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val 220 225 230

TTG TAT TTT CAT CAT ATT ATC TAC TAT AAT GGT AAA AAT GCA GGC AAT GCA 253  
 Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr-Ans-Gly Lys-Ans-Ala Gly-Ans-Ala 245  
 235  
 ACA TCT AGC CTT GTT GCA GGC CTT CAA GGA GCT AAT CTC ACC AAT ATG 301  
 Thr Ser Thr Leu Val 255 260  
 ACT GGC AAT TAC CAT TTT GGA CAT CTG TCT GTG TTT GAT GAT CCT AAT 349  
 Thr Gly Asn Tyr His Phe Gly Asp Leu Ser Val Phe Asp Asp Pro Ile 280  
 270 275 280  
 ACT GGT GAC AAC AAT CTT CAT TCT CTT CTT CTT GGA GGA GCT CAG GGC 397  
 Thr Val Asp Asn Asn Leu His-Ser-Pro-Val-Gly-Arg Ala Gln-Gly 295  
 285  
 TTT TAC TTC TAT GTC-ATG-ATG-AAT ACA-TTC-AGT GCT TGG CTT GGG TTC 445  
 Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe 310  
 300  
 ACA TTT GTG CTG AAC TCA ACA CAT TAT AAA GGC ACT ATT ACT TTC GGT 493  
 Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Gly 325  
 315 320  
 GGA GCA GAC GCA ATT TTG GCT RAG TAC ACA GAT ATA TCT GTT GTG GGT 541  
 Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly 340  
 330  
 GGT ACT GGA GAT TTC ATG ATG GCA GCA ATT GCT ACA ATC CAT ACT 589  
 Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Asp Thr 360  
 350 355  
 GAT GCA TAT GAG GCA GAT GTT TAC TTC AGG CTA AGG GTG AAT ATC ACA 637  
 Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val 375  
 365 370  
 CTC TAT GAG TGT TAC TGTTCATCG GTATCTATG TAGATAGCT CATTCTGATA 692  
 Leu Tyr Glu Cys Tyr 380  
 TGGCTATAT ATTTCGAG CATAGTAGT TAAGTTTAT AACTAGTAG TCAACATCA 752  
 GATCATGGA AACTGGTG CTCATCCCA GTTTCATAT TTCTAATA ACTCTCTCG 812  
 ACTATACAT TTATGATG TTGAGATG TGTGATG TGTGCTAT TACTATATCA TATACCTAT 872  
 TTATACATG TTTTACATG TTTAATAA AAAAAAAAAA A 913

## (2) 配列番号33の情報は:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 190アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (C) トポロジー: 直鎖状  
 (D) 配列の種類: タンパク質

## (1) 配列番号33の情報は:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 190アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (C) トポロジー: 直鎖状  
 (D) 配列の種類: タンパク質

Met Ala Ile Trp Asn Gly Arg Val Leu Asn Leu Cys Ile Leu Trp Leu 15  
 1  
 Leu Val Ser Ile Val Leu Leu Asn Gly Ile Asp Cys His Ser Arg Lys 30  
 20 25  
 Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 45  
 35 40  
 Ile Ile Tyr Asn Gly Lys Asn Ala Gly Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val 60  
 50 55  
 Ala Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Tyr His 80  
 65 70 75  
 Phe Gly Asp Leu Ser Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Val Asp Asn Asn 95  
 85 90  
 Leu His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 110  
 100 105 110  
 Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 125  
 115 120  
 Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Gly Gly Ala Asp Pro Ile 140  
 130 135 140  
 Leu Ala Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe 160  
 145 150 155  
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Asp Thr Asp Ala Tyr Glu Gly 175  
 165 170  
 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 190  
 180 185 190

## (2) 配列番号34の情報は:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 390塩基対  
 (B) 型: 核酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖状

## (1) 配列の種類: Thujaplicata指揮タンパク質PSD-Tp8 cDNA

## (1) ハイボセティカル: NO

## (1) アンチセンス: NO

## (1) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS  
 (B) 存在位置: 44..619

## (1) 配列番号34の情報は:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 390塩基対  
 (B) 型: 核酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖状

## (1) 配列の種類: Thujaplicata指揮タンパク質PSD-Tp8 cDNA

## (1) ハイボセティカル: NO

## (1) アンチセンス: NO

## (1) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS  
 (B) 存在位置: 44..619

## (1) 配列番号34の情報は:

## (1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 390塩基対  
 (B) 型: 核酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖状

## (1) 配列の種類: Thujaplicata指揮タンパク質PSD-Tp8 cDNA

## (1) ハイボセティカル: NO

## (1) アンチセンス: NO

## (1) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS  
 (B) 存在位置: 44..619

GTT TTG CTG AAT GCT ATA GAT TGC CAT ACT ACA AAA AAG CTT CCA 151  
 Val Leu Leu Asn Gly Ile Asp Cys His Ser Arg Lys Lys Lys Leu Pro 223  
 AAG GCA TGT AGG AAT CTT GTT TTG TAT TTT CAT GAT ATT ATC TAC AAT 199  
 Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn 240  
 GGT AAA AAT GCA GGC AAT GCA ACA TCT ACG CTT GTT GCA GCC CTT CAA 247  
 Gly Lys Asn Ala Gly Asn Ala Thr Ser Thr Thr Val Ala Ala Pro 255  
 GGA GCT AAT CTC ACC AAT ATG ACT GGC AAT TAC CAT TTT GGA GAT CTG 295  
 Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Tyr His Phe Gly Asp Leu 275  
 GCT CTG TTT GAT GAT CTT AAT CTT GAT GAC AAC AAT CTT CAT TCT CTT 343  
 Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Val Asp Asn Asn Leu His Ser Pro 285  
 CTT GTG GGA AGA GCT CAG GGC TTT TAC TTT GAC ATG AAG AAT ACA 391  
 Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr 305  
 TTC AGT CTT TGG CTT GGG TTC ACA TTT GTG CTG AAC TCA ACA GAT TAT 439  
 Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr 320  
 AAA GCG ACT AAT ACT TTC GGT GGA GCA GAC CCA AAT TTG GCT AAG TAC 487  
 Lys Gly Thr Ile Thr Phe Gly Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala Lys Tyr 335  
 ACA GAT ATA TCT GAT GGT GGT ACT GGA GAT TTC TTG ATG GCA AGA 535  
 Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg 345  
 GGA ATT GCT ACA ATC GAT ACT GCA TAT GAG GGA GAT GTT TAT TTC 583  
 Gly Ile Ala Thr Ile Asp Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe 365  
 AGG CTA AGG GTG AAT ATC ACA CTC TAT GAG TGT TAC TGATCGATGG 629  
 Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 375  
 GTATCTATG TAGAATGCT CAATCTGTA TGGCTAATAT ATTTCAGAG CATAGTAGT 689  
 TAGTTTAT AACTAGTAG TGAACCTGAA GAUATTCGA AACTGGGCTG CTCTGCAAA 749  
 GTTTCATAT TTCTAATAA AGTCTGCTCG ACTATACAT TTATGATTC TTGAGATTC 809  
 TCTGCTTAT TACTTATGA ATAGCTATT TTAAOMAG TTTCACAG TTAAAGATT 869  
 CTCBAAAAA AAAAAAAAAA A 890

## (D) トポロジー：直鎖状

## (11) 配列の種類：タンパク質

## (x1) 配列：配列番号 3 5 :

Met Ala Ile Trp Asn Gly Arg Val Leu Asn Leu Cys Ile Leu Trp Leu 1  
 10 5 15  
 Leu Val Ser Ile Val Leu Leu Asn Gly Ile Asp Cys His Ser Arg Lys 20  
 25 30  
 Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 35  
 40 45  
 Ile Ile Tyr Asn Gly Lys Asn Ala Gly Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val 50  
 55 60  
 Ala Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Tyr His 65  
 70 75 80  
 Phe Gly Asp Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Val Asp Asn Asn 85  
 90 95  
 Leu His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 100  
 105 110  
 Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 115  
 120 125  
 Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Gly Gly Ala Asp Pro Ile 130  
 135 140  
 Leu Ala Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Thr Gly Asp Phe 145  
 150 155 160  
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Asp Thr Asp Ala Tyr Glu Gly 165  
 170 175  
 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180  
 185 190

## (2) 配列番号 3 6 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

(A) 長さ：30アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：関連なし

(D) トポロジー：関連なし

(11) 配列の種類：ペプチド

(111) ハイボセディカル：NO

(112) アンチセンス：NO

(113) フラグメント型：Forsythia intermedia (t)-ピノシノール/(t)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来のN末端配列

(x1) 配列：配列番号 3 6 :

## (2) 配列番号 3 5 の情報 :

## (1) 配列の特徴 :

(A) 長さ：192アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

Gly Lys Ser Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg  
1 5 10 15  
Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Glu Gly His Glu Thr Tyr  
20 25 30

(2) 配列番号37の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 16アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号37:

Phe Met Asp Ile Ala Met Xaa Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys  
1 5 10 15

(2) 配列番号38の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 13アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号38:

Leu Pro Xaa Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met  
1 5 10

(2) 配列番号39の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 12アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(A) 長さ: 8アミノ酸  
(B) 型: アミノ酸  
(C) 鎖の数: 関連なし  
(D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号39:

Glu Val Val Glu Xaa Xaa Glu Lys  
1 5

(2) 配列番号40の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 10アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号40:

Tyr Xaa Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg  
1 5 10

(2) 配列番号41の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 12アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia (t)-ピノレシノール/(t)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部臭化シアアンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号 4 1:

Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met  
1 10

(2) 配列番号 4 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 7 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジ: 関連なし
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia (t)-ピノレシノール/(t)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部臭化シアアンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号 4 2:

Met Asp Pro Ala Lys Lys Phe Met  
1 5

(2) 配列番号 4 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 7 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジ: 関連なし
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia (t)-ピノレシノール/(t)-ラリシ  
レシノールレダクターゼ由来の内部臭化シアアンフラグメ  
ント

(xi) 配列: 配列番号 4 3:

Met Leu Ile Ser Phe Lys Met  
1 5

(2) 配列番号 4 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 記載: PCRプライマー-PLN5J
- (iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号 4 4:

ATGATGCGG GACGCGGTA

20

(2) 配列番号 4 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 19 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 記載: PCRプライマー-PLR14RJ
- (iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号 4 5:

GTTCATGCG NATTCGAT

19

(2) 配列番号 4 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 記載: PCRプライマー-PLR15RJ
- (iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号 4 6:

TCTCAAGG TACATTC

## (2) 配列番号47の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1060塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F11
- (iii) ハイブリゼーション: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 28..963

## (ii) 配列番号47:

ATTGGGCGAC GAGGAGGACG CACAGAC ATC GGA AAA AGC AAA GGT TTG ATC 51  
Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile 195  
ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GGG AGG AGA TTG GTT PAA GCA AGT TTA 99  
Ile Gly Gly Thr Gly Lys Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ile 215  
GCT CAA GGT CAA ACA TAC ATT CTG CAT AGG CCT GAA ATT GGT GGT 147  
Ala Glu Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val 230  
GAT ATT GAT AAA GGT GAA ATC CTA ATA TTT AAA ATC CAA GCA GCT 195  
Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala 245  
CAT CTT GTA TCT GGT TCT TTC AAG GAT TTC AAC AGT CTG GTC GAG GCT 243  
His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala 250  
GTC AAG CTC GTA GAC GTA ATC AGC GCG ATT TCT GGT GGT CAA ATT 291  
Val Lys Leu Val Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile 280  
CGA ASC CAT CAA ATT CTT CTA CTC AAG CTT GTT CAA GCT ATT AAT 339  
Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys 295  
GAG GCT GGA AAT GTC AAG ACA TTT TTA CCA TCT CAG TTT GGA ATG GAT 387  
Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp 310  
CCT GCA AAA TTT ATG AAG GCG GGT GAA CCC GGA AAG GTA ACA CTT 435  
Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly 325  
GAT GAG AAG ATG GTG GTA AGG AAA GCA ATT CAA AAG CTT GGT ATT CCT 483  
Asp Glu Lys Met Val Val 335

TTC ACA TAT GTC TCT CCA AAT TGC TTT GGT TAT TTC TTG GGA GGT 531  
Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly 350  
CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT TCT TTT GTC ATT ATA 579  
Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile 375  
CAT GCA GAT GGT AAC AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA GAT GAT ATA 627  
His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile 385  
GCA ACT TAT GCC ATC ATC AAA ACA ATT TAT GAT CCA ACA ACC CTC AAC AAG 675  
Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys 400  
ACA ATC TAC ATT AGT CCT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA ACA GAA GTT 723  
Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val 415  
GTT CAG ACA TGG GAG AAG CTT ATT GGG AAA GAA CTG CAG AAA ATT ACA 771  
Val Glu Thr Trp Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Lys Thr 430  
CTC TCG AAG GAA GAT TTT TTA GGC TCC GTG AAA GAG CTC GAG TAT GCT 819  
Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala 445  
CAG CAA GTG GGA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TCC 867  
Gln Glu Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys 465  
CTT ACG AGT TTT GAG ATA GGA GAT GAA GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT 913  
Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr 475  
CCT CAG GGT TAT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC AAG CTT TAC GTG 963  
Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr 500  
TACTGGAAG CTTCCATTA TTATGTAT ATATATTAA TCAGTATGA GTTTAAAT 1023  
TCGTAATAA ATATGTGTTG AATTTCCTT CCMAAA 1060

## (2) 配列番号48の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 312アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

## (ii) 配列番号48:

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15  
1

Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile  
20 30  
Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu  
35 45  
Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys  
50 55 60  
Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile  
65 70 75 80  
Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln  
85 90 95  
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe  
100 105 110  
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala  
115 120 125  
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys  
130 135 140  
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys  
145 150 155 160  
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu  
165 170 175  
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala  
180 185 190  
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile  
195 200 205  
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys  
210 215 220  
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile  
225 230 235 240  
Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala  
245 250 255  
Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr  
260 265 270  
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp  
275 280 285  
Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val  
290 295 300  
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val  
305 310

(2) 配列番号49の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1112塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジ: 直線状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F12

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を載す記号: CDS

(B) 存在位置: 44..979

(xi) 配列: 配列番号49:

ATTTCGGCAC GAGCTGCTGC DCCACACGGA AAAACACGGA GAG ATG GGA AAA AGC  
35  
Met Gly Lys Ser  
AAA GTT TTG ATC ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GGG AGG AGA TTG GTT  
103  
Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Val  
320 325 330  
AAG GCA AGT TTA GCT CAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGG CCT  
151  
Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro  
335 340 345  
GAA ATT GGT GTT GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATG CTA ATA TCA ATT AAA  
199  
Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys  
350 355 360  
ATG CAA GGA GCT CAT GTT CTA TCT GCT TCT TAC AAC GAT TTC AAC AGT  
247  
Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser  
365 370 375  
CTG GTC GAG GCT GTC AAG CTC GTA GAC GTA ATC ATC AGC GGC ATT TCT  
295  
Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser  
385 390 395  
GGT GTT CAT ATT CGA AGC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC AAG CTT GTT  
343  
Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Lys Leu Val  
400 405 410  
CAA GCT ATT AAA GAG GCT GGA AAT GTC AAG AGA TTT TTA GCA TCT GAG  
391  
Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu  
415 420 425

(11)配列の種類：タンパク質

(x1)配列：配列番号50：

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15  
1 10  
Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile 20 30  
Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 35 45  
Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 50 60  
Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 65 75  
Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln 80 90  
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 100 110  
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala 115 125  
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys 130 140  
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys 145 155  
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu 160 175  
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala 180 190  
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile 195 205  
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys 210 220  
Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val Val Gln Thr Thr Trip Glu Lys Leu Ile 225 235  
Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala 240 255  
Ser Val Lys Glu Leu Gln Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr 260 270  
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp 275 285  
Gln Glu Gln Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val 290 300  
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 305 310

TTT GGA ATG GAT CCG GCA AAA TTT ATG GAT AGC GGC ATG GAA CCC GCA 439  
Phe Gly Met Asp Pro Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly 440  
435  
AAG GTA ACA CTT GAT CAG AAG ATG GTG GTA AGC AAA GCA ATT GAA AAG 487  
Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys 490  
445  
GCT GCG ATT CCG TTC ACA TAT GTC TCT GCA ATY TGC TTT GCT GGT TAT 535  
Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr 540  
465  
TTC TTG GCA GGT CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT ACA GAT 583  
Phe Leu Gly Gly Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp 590  
485  
TTT GTC ATT ATA CMT GGA GAT GGT AAC AAA GCA ATR TAT AAC ATT 631  
Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asp 640  
495  
GAA GAT GAT ATA GCA ACT TAT GTC ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA AGA 679  
Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg 720  
510  
ACC CTC AAC AAG ACA ATC TAC ATT ACT CCG CCA AAA AAC ATC CTT TCA 727  
Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser 730  
535  
CAA ACA GAA CTT GTT CAG ACA TCG CAG AAG CTT ATT GCG AAA GAA CTG 775  
Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Thr Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu 780  
545  
CAG AAA ATT ACA CTC TCG AAG GAA GAT ITT ITA GCG TCC GTG AAA GAG 823  
Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu 565  
560  
CTC GAG TAT GGT CAG CAA GTG GCA TTA AGC CMT TAT CMT GAT GTC AAC 871  
Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val 580  
575  
TAT CAG GGA TGC CTT ACG AGT TTT GAG ATA GCA GAT GAA GAA GCG GCA 919  
Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Thr Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Glu Ala 920  
590  
TCT AAA CTT TAT CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC 967  
Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu 970  
605  
AAG CCG TAC GTG TAGTGAAG CTTCCCAATA TTATGTAT AATATTAAA 1019  
Lys Arg Tyr Val  
TCAATATGTA GTTTAAATT TCGTAAATA ATATGATG ATTTTCCTT CAAACGATG 1079  
GTCAATGAA ATGCATATT GAGTCAAA AAA 1112

(2)配列番号50の情報：

- (1)配列の特徴：  
(A)長さ：312アミノ酸  
(B)型：アミノ酸  
(C)トポロジー：直鎖状



(2) 配列番号51の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1124塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-Fi3
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 29..964

(xi) 配列: 配列番号51:

AATTCGGCAC GAGGAGAAC AGCAGAG ATG GCA AAA AGC AAA GAT TTG ATC  
 Met Gly 315  
 ATT GCG GGT ACA GCG TAC TTA GCG AGC AGA TTG GTT AAG GCA AGT TTA  
 Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu  
 325  
 GCT CAA GGT CAT GAA GCA TAC ATT CTG CAT AGG GCT GAA ATT GGT GTT  
 Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val  
 340  
 GAT ATT GAT AAA GAT GAA ATC CTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GCA GCT  
 Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala  
 355  
 CAT CTT GTA TCT GGT TCT TTC AGC GAT TTC AGC AGT CTG GTC GAG GGT  
 His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala  
 370  
 GTC AAG CTC GTA CAC GTA ATA ATC AGC GCG ATT TCT GGT GTT CAT ATT  
 Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile  
 385

CGA AGC CAT CAA ATT CTT CTA CTC AAG CTT GTT CAA GCT ATT AAA  
 Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Val Glu Ala Ile Lys  
 405  
 GAG GCT GGA AAT GTC AAG AGA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GCA ATG CAT  
 Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe Cys Met Asp  
 420  
 CCT GCA AAA TTT ATG CAT ACG GCT ATG GAA CCC GGA AAG GTA ACA CTT  
 Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu  
 435  
 GAT GAG AAG ATG GTC GTA AGC AAA GCA ATT GAA AAG GCT GGG ATT CTT  
 Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro  
 450  
 TTC ACA TAT GTC TCT GCA TAT TGC GTT GCT TAT TAT TTC TTG GGA GGT  
 Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly  
 465  
 CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT ACA GAT TTT GTC ATT ATA  
 Leu Cys Gln Phe 485  
 CAT GGA GAT GGT AAC AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA CAT CAT ATA  
 His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile  
 500  
 GCA ACT TAT GCT ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA AGA ACC CTC AAC AAG  
 Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg 525  
 ACA ATC TAC ATT AGT CTT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA AGA GAA GTT  
 Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val  
 535  
 GTT CAG ACA TCG CAG AAG CTT ATT GCG AAA GAA CTG CAG AAA ATT ACA  
 Val Gln Thr Tyr Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr  
 545  
 CTC TCG AAG GAA GAT TTT TTA GCG TCC GTG AAA GAG CTC GAG TAT GCT  
 Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala  
 560  
 CAG CAA GTG GCA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GCA TGC  
 Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys  
 580  
 CTT ACG AGT TTT GAG ACA GAT GAA GAT GCA GCA TCT AAA CTT TAT  
 Leu Thr Ser Phe Gln Ile Gly Asp Gln Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr  
 605  
 CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC AAG COT TAC GTG  
 Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val  
 620  
 TAGTTCGAGC CTTTCACATTA TTAATCTAAAT AATATTTAAA TCGTAGTGA GTTTAAAT  
 1024  
 TCGTTAAATA AATAGCTGTC AATTTTCCTT CAACACGCTG CTCCTATGAA ATGCAATTTT  
 1084  
 GAAGTCTCT TCTGCGAAT ATTATGCGAA ATAAAAA  
 1124

Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr  
260  
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp  
275  
Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val  
290  
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val  
305

(2) 配列番号 53 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1097塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F14
- (iii) ハイボセディカル: NO
- (iv) アンセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 29..984

(xi) 配列: 配列番号 53

ATTTCGGCAC GAGGAGAGAG ATG GGA AAA AGC AAA GTT TTG ATC  
Met Gly 315  
ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GGG AGG AGA TTG GTT AGC GCA AGT TTA  
Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala 335  
GCT CAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGG OCT GAA ATT GGT GTT  
Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val  
345

(2) 配列番号 52 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 312アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 52

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly  
1  
Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile  
20  
Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu  
35  
Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys  
50  
Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile  
65  
Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln  
80  
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe  
100  
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala  
115  
Met Gln Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys  
130  
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys  
145  
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Lys Glu Phe Phe Gly Lys Ile Leu  
160  
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala  
175  
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile  
190  
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys  
205  
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile  
220  
Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala  
235

GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATC CTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GGA GCT 196  
 Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala 385  
 CMT CTT GTA TCT GGT TCT TCC TAG GAT TTC AAC AGT CTG CTC GAG GCT 244  
 His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala 380  
 GTC TAG CTC GTA GAC GTA ATC AGC GCC ATT TCT GGT GTT GAT ATT 292  
 Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile 400  
 CCA AGC CMT CAA ATT CTT CTT CAA CTC TAG CTT GTT GAA GCT ATT AAA 340  
 Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys 415  
 GAG CTT GCA AAT GTC AAG ACA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATC GAT 388  
 Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp 430  
 CTT GCA AAA TTT ATG GAT AGC GCC ATC GAA CCC GCA AAG GTA ACA CTT 436  
 Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu 445  
 GAT GAG AAG ATG GTG GTA AGC AAA GCA ATT GAA AAG GCT GGG ATT CTT 484  
 Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro 450  
 TTC ACA TAT CTC TCT CCA AAT TCG TTT CTT GGT TAT TTC TCG GCA GCT 532  
 Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly 465  
 CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT TCT ACA GAT TTT GTC ATT ATA 580  
 Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile 485  
 CMT GGA GAT GGT AAC AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA GAT GAT ATA 628  
 His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile 505  
 GCA ACT TAT GCC ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA ACA ACC CTC AAC AAG 676  
 Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys 520  
 ACA ATC TAC ATT CTT CTT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA ACA GAA GTT 724  
 Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val 535  
 GTT CAG ACA TCG GAG AAG CTT ATT GCG AAA GAA CTC CAG AAA ATT ACA 772  
 Val Glu Thr Trp Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr 545  
 CTC TCG AAG GAA GAT TTT TTA GCC TCC GTG AAA CAG-CTC GAG TAT CTT 820  
 Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala 570  
 CAG CAA GTG GGA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TCG 868  
 Glu Glu Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys 585  
 CTT ACG AGT TTT GAG ATA GGA GAT GAA GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT 916  
 Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Ala Thr Lys Leu Tyr 600

CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT CTC GAA GAG TAC CTC AGC CCT TAC CTC 964  
 Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 610  
 TACTGGAGG CTTTCGATTA TTTATGTAAT AGATTTTAA TCAATATGA GTTTTAAIT 1024  
 TCTTTAAATTA AATATGTTTG AATTTTCTT CAAAGAGTG GTTGATTTGA ATGGATTTT 1084  
 GAAAAAAA AAA 1097  
 (2) 配列番号 54 の情報：  
 (1) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：312アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (C) トポロジー：直鎖状  
 (11) 配列の種類：タンパク質  
 (x1) 配列：配列番号 54：  
 Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15  
 1  
 Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Glu Glu Glu Thr Tyr Ile 25  
 20  
 Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 45  
 35  
 Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 60  
 50  
 Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 80  
 65  
 Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu 95  
 85  
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 110  
 100  
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala 125  
 115  
 Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys 140  
 130  
 Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys 160  
 145  
 Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu 175  
 165  
 Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala 185  
 180  
 Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile 205  
 195

Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys  
210 215 220  
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile  
225 230 235  
Gly Lys Gln Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala  
240 245 250  
Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr  
255 260 265 270  
His Asp Val Asn Tyr Gln Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp  
275 280 285  
Glu Glu Gln Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val  
290 295 300  
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val  
305 310

(2) 配列番号 55 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 1109塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F15

(iii) ハイボセディカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 31..966

(xi) 配列: 配列番号 55

AATTCGGCAC GAGGAGAAA ACAGAGAGAG ATC GGA AAA ACC AAA GTT TTG ATC  
315 320  
Met Gly Ser Lys Val Leu Ile  
102  
ATT GGG GGT ACG GGG TAC TTA GGG AGG ACG TTT GGT ACG GCA AGT TTA  
325 330  
Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu  
150  
GCT CAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGG CTT GAA ATT GGT GTT  
335 340  
Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile 345  
350  
GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATG CTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GCA GCT  
355 360  
Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala  
246  
CAT CTT CTA TCT GCT TCT TTC TAG GAT TTC AAC AGT AGT CTC GTC GAG GCT  
365 370  
His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala  
294  
GTC AAG CTC GTA GAC GTA ATC AGC GCC ATT TCT GGT GTT CAT ATT  
375 380  
Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile  
385 390  
GGA ACC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC AAG CTT GGT GAA GCT ATT AAA  
395 400  
Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys  
342  
GAG GCT GGA ATT GTC AAG AAA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATG GAT  
405 410  
Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 415  
420  
CCT GCA AAA TTT ATC CAT ACG GGC ATG GGA CCC GCA AAG GCA ACA CTT  
425 430  
Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu  
438  
GAT GAG AAG ATC CTC GTA ACG AAA GCA ATT GAA AAG CTT GGG ATT CTT  
440 445  
Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro  
486  
TTC ACA TAT CTC TCT GCA AAT TGC TTT GCT GGT TAT TTC TTC GGA GGT  
450 455  
Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly  
534  
CTC TGT GAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT ACG AAT TTT GTC ATT ATA  
460 465  
Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile  
582  
CAT GGA GAT GGT AAG AAA GCA ATR TAT AAC AAT GAA GAT GAT GAT ATA  
470 475  
His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile  
630  
GCA ACT TAT GGC ATC AAG ACA ATT TAT GAT CCA AAG ACC CTC AAC AAG  
480 485  
Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys  
678  
ACA ATC TAC ATT AGT CTT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA AAG GAA GAT  
490 495  
Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Lys Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val  
726  
GTT CAG ACA TGG GAG CAT ATT GGG AAA GAA CTG CAG AAA ATT ACA  
500 505  
Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Lys Ile Thr  
774  
510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565

CTC TCC AAC CAA CAT TTT TTA GCC TCC GAG AAA GAG CTC GAG TAT GCT 822  
 Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala 575  
 565  
 CAG CAA GTG GGA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TCC 870  
 Glu Glu Val Glu Lys Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys 590  
 580  
 CTT ACG AGT TTT CAG ATA GGA GAT GAA GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT 918  
 Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr 600  
 595  
 CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC AAG GAT TAC GTG 966  
 Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 620  
 610  
 TACTCCAAAG CTTTCCATTA TTATGCTAT ATATTTTAAA TCAGTAGCTA GTTTTAATT 1026  
 TCGTAAATA AVAGTGTG AATTTTCCTT CAAACGAGTG GTCCATTCGA ATCCGATTTT 1086  
 GAGTCATCT TCTCCAAA AAA 1109

(2) 配列番号 56 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 312 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 56:

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15  
 1  
 Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Glu Gly His Glu Thr Tyr Ile 30  
 20  
 Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 45  
 35  
 Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 60  
 50  
 Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Ile 80  
 65  
 Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu 95  
 85  
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 110  
 100  
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala 125  
 115  
 Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys 140  
 130  
 Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys 160  
 145  
 150

Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu 175  
 165  
 Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala 190  
 185  
 Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile 205  
 195  
 Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys 220  
 215  
 Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val Val Glu Thr Thr Glu Lys Leu Ile 240  
 225  
 Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala 255  
 245  
 Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Tyr Ala Glu Glu Val Gly Leu Ser His Tyr 270  
 260  
 His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp 285  
 275  
 Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val 300  
 290  
 Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 310  
 305

(2) 配列番号 57 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1107 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F16

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS

(9) 存在位置: 27, 962

(11) 配列: 配列番号 57

AATTCCGAC GGAACACAG AGAGAG ATG GGA AAA AGC AAA GAT TTG ATC ATT 53  
 Met Gly Lys Ser Lys Val Leu 320  
 GCG GGT ACA GCG TAC TCG GCG ACG ACA TCG GTT AGC GCA AGT TTA GCT 101  
 Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala  
 325 330 335  
 CAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGC CTT GAA ATT GGT GTT GAT 149  
 Glu Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp  
 340 345 350  
 ATT GAT AAA GTT GAA ATG GTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GGA GCT CAT 197  
 Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala His  
 355 360 365  
 CTT GTA TCT GGT TCT ATG AGG GAT TTC AAC AGT CTG CTC GAG GCT GTC 245  
 Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val  
 370 375 380  
 AAG CTC GTA GAC GTA GTC ATC ACG GGC ATT TCT GGT GTT CAT ATT CCA 293  
 Lys Leu Val Asp Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg  
 390 395 400  
 AGC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC MAG CTT GTT GAA GCT ATT AAA GAG 341  
 Ser His Glu Ile Leu Leu Glu Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu  
 405 410 415  
 GGT GGA AAT CTC MAG AGA GTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATG GAT CTT 389  
 Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro  
 420 425 430  
 GCA AAA TTT ATG CAT ACG GGC ATC GAA CCG GGA AGC GTA ACA CTT GAT 437  
 Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp  
 435 440 445  
 GAG AAG ATC CTC GTA ACG AAA CCA ATT GAA AAG GGT GCG ATT CTT TTC 485  
 Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe  
 450 455 460 465  
 ACA TAT GTC TCT GCA AAT TGC TTT GGT GAT TAT TTC TTG GGA GGT CTC 533  
 Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu  
 470 475 480  
 TGT CAA TTT GCG AAA AAT CTT CTT TCT ACG CAT TTT CTC ATT ATA CAT 581  
 Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His  
 485 490 495  
 GGA GAT GGT AAG AAA AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA GAT ATA GCA 623  
 Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala  
 500 505 510  
 ACT TAT GCG ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA AGA ACC CTC AAC AAG ACA 677  
 Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr  
 515 520 525

ATC TAC AAT AGT CCT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA ACA GAA GAT GTT 725  
 Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val Val  
 530 535 540 545  
 CAG ACA TCG GAG AAG CAT ATT GGG AAA GAA CTG CAG AAA ATT ACA CTC 773  
 Glu Thr Trp Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr Leu  
 550 555 560  
 TCG AAG GAA GAT TTT TTA GCC TCC GTG AAA GAG CTC GAG TAT GCT CAG 821  
 Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Glu  
 565 570 575  
 CAA CTG GGA TTA ACC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TGC CTT 869  
 Glu Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys Leu  
 580 585 590  
 ACG AGT TTT GAG ATA GGA GAT GAA GAG CCA TCT AAA CTT TAT CCA 917  
 Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro  
 595 600 605  
 GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTC GAA GAG TAC CTC CAG CTT TAC CTC 962  
 Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val  
 610 615 620  
 TAGTTGAAAG CTTTCACATTA TTTATGTAT ATATTTTAAA TCAATGATTA GTTTTAAAT 1022  
 TCGTTTAAATA ATATGTGTG AATTTCCTT CAACAGGATG GTCCATGGA ATCGAATTTT 1082  
 GAATCTCATCT TCTCCACAAA AAAAA 1107

## (2) 配列番号 58 の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 312 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(11) 配列: 配列番号 58:

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15  
 1 10  
 Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Leu Ala Glu Gly His Glu Thr Tyr Ile 25  
 20 30  
 Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 45  
 35 40  
 Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 60  
 50 55  
 Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 75  
 65 70  
 Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu 95  
 85 90  
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 105  
 100 110

(C41)

特表2001-507831

(C42)

特表2001-507831

Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala  
115 120  
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys  
130 140  
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys  
145 150 155  
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu  
165 170  
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Ala  
180 185  
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile  
195 200  
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys  
210 215  
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile  
225 230 235  
Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala  
240 245  
Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr  
250 255  
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp  
260 265  
Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val  
270 275  
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val  
280 285  
305 310

(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 記載：「cDNA合成リンカープライマー」  
(iii) ハイボセティカル：NO

(xi) 配列：配列番号59：

GTCTCGAGTT TTTTITTTT TTTT

26

(2) 配列番号60の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジ：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「cDNA合成プライマー」

(iii) ハイボセティカル：NO

(xi) 配列：配列番号60：

GCACATACCA GTATGATATA G

21

(2) 配列番号61の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1190塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジ：直鎖状

(ii) 配列の種類：Thuja plicata cDNA PLR-TpI

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：13..951

(xi) 配列：配列番号61：

GCACATACCA GT ATG GAT AAC AAG ACC ACA CTT CTC ATA CTC GCG GCG  
Met Asp Lys Lys Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly  
315 320

49

(2) 配列番号59の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26塩基対

(B) 型：核酸

ACT GGT TAT ATA GCC AAA AGA ATT CTG AAT GCC AGT ATA TCT CTT GGC 96  
 Thr Gly Tyr Ile Gly 330  
 323  
 CAT CCC ACT TAT GGT TTG TTC AGA CCA GAA CTG CTC TCT AAG ATT GAC 144  
 His Pro Thr Tyr Val Leu Leu Phe Arg Pro Glu Val Val Ser Asn Ile Arg 355  
 345  
 AAA GTG CAG AAG CTG TTA TAC TTC TAC TTT GGT GGT GCC AAA CTT ATT 192  
 Lys Val Gln Met Leu Leu Tyr Phe Phe Gln Gln Leu Gly Ala Lys Leu Ile 370  
 363  
 GAG GGT TCA TTG GAT GAC CAC CAA AGG CTT GTG GAT GGT CTG AAA CAA 240  
 Glu Ala Ser Leu Asp Asp His Gln Arg Leu Val Asp Ala-Leu Lys Gln 385  
 375  
 GTG GAT GTT GTC ATA AGT GCT TTG GCA GGA GGT GGT CTA AGC CAC CAT 288  
 Val Asp Val Val Ile Ser Ala Leu Ala Gly Gly Val Leu Ser His His 400  
 395  
 ATA CTT GAA CAG CTC AAA CTA CTA GAA CCA GGC ATC AAA GAA GGT GGA AAT 336  
 Ile Leu Glu Gln Leu Leu Val Gln Ala Ile Lys Lys Glu Ala Gly Asp 415  
 410  
 ATT AAG AGA TTT CTT CCA TCT GAG TTT GGC AAG GAT CCA GAT ATT ATG 384  
 Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser Gln Phe Gly Met Asp Pro Asp Ile Met 425  
 435  
 GAG CAT GCA TTG CAA CTT GGT AGC ATT ACA TTC ATC GAT AAG ACG AAG 432  
 Glu His Ala Leu Leu Gln Pro Gly Ser Ile Thr Phe Ile Asp Arg Arg Lys 445  
 440  
 GTT CGG CGT GCC ATT GAA CCA TCC ATT CTT TAC ACA TAT GTG TCT 480  
 Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala Ala Ser Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser 455  
 465  
 TCA AAT AAG TTT GGT TAC TTT GCT GGA AGT TTA GCT CAA CTT GAT 328  
 Ser Asn Met Phe Ala Gly Tyr Phe Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Asp 470  
 475  
 GGT CAT AAG AAG CTT CTT CCA GAC CAC CAG CTC ATC ATC TAT GGA GAT GGA 576  
 Gly His Met Met Pro Pro Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asn Gly 490  
 485  
 AAT CTT AAA GGT ATT TGG CTG GAT GAA GAT GAT GAT GGA ACA TAC ACA 624  
 Asn Val Lys Gly Ile Trp Val Asp Glu Asp Asp Val Gly Thr Tyr Thr 510  
 515  
 ATC AAA TCA ATT GAT GAT CCA ACC CTT BAC AAG-AGT AAG TAT ATT-ATT 672  
 Ile Lys Ser His Asp Asp Pro Gln 525  
 530  
 AGG CCA CTT AAG AAT ACC CTT TCA CAG AAG GAA GTT ATA CAA AAT TGG 720  
 Arg Pro His Met Asn Ile Leu Leu Ser Gln Lys Glu Val Ile Gln Ile Trp 545  
 555  
 CAG AAG TTA TCA CAA CAA CAC CTC GAT AAA ATA TAC ATT TCT TCT CAA TAT 768  
 Glu Arg Leu Ser Glu Gln Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Ile Ser Ser Gln 560  
 565

GAC TTT CTT GCA GAT ATG AAA GAT AAA TCA TAT GAA GAG AAG ATT GTA 816  
 Asp Phe Leu Ala Asp Met Lys Asp Lys Ser Tyr Glu Glu Lys Ile Val 575  
 585  
 CCA TGT CAT CTC TAC CAA AAT TTC TTT AGR CCA GAT CTT TAC AAC TTT 864  
 Arg Cys His Leu Tyr Gln Ile Phe Phe Arg Gly Asp Leu Tyr Asn Phe 590  
 595  
 GAA ATT GGC CCC AAT GCT ATT GAA GCT ACC AAA CTT TAT CCA GAA CTC 912  
 Glu Ile Gly Pro Asn Ala Ile Glu Ala Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val 600  
 605  
 AAA TAC GTA ACC AAG GAT TCA TAT TTA GAG CCG TAT GTT TCAATATCTT 961  
 Lys Tyr Val Thr Met Asp Ser Tyr Leu Glu Arg Tyr Val 620  
 615  
 TCTAGTTTGT TATATGTTT TTCTACATGA TAATGTGGA GGTACTATTI CAATATTT 1021  
 AGACTATGG CTCATTTTA BAATAGAGT ACATTTATTI CCAATTTACT TACATTTT 1081  
 TTACTTCAAT ATTCTACTCA ATATAGACTT GGTATPAGA ATATGATAT 1141  
 TATATATTT TATAGATCTT ATTITTAATA AAAAAAAAA AAAAAAAAA 1190

(2) 配列番号 62 の情報:  
 (1) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 313アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) トポロジー: 直鎖状  
 (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 62:  
 Met Asp Lys Lys Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Thr Gly Tyr Ile 15  
 1  
 Gly Lys Arg Ile Val Asn Ala Ser Ile Ser Leu Gly His Pro Thr Tyr 20  
 25  
 Val Leu Phe Arg Pro Glu Val Val Ser Asn Ile Asp Lys Val Gln Met 35  
 40  
 Leu Leu Tyr Phe Lys Gln Leu Gly Ala Lys Leu Ile Glu Ala Ser Leu 50  
 55  
 Asp Asp His Gln Arg Leu Val Asp Ala Leu Lys Gln Val Asp Val 65  
 70  
 Ile Ser Ala Leu Ala Gly Val Leu Ser His His Ile Leu Glu Gln 85  
 90  
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe 100  
 105  
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Asp Ile Met Glu His Ala Leu 115  
 120  
 125



Gln Pro Gly Ser Ile Thr Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala  
130 135 140  
Ile Glu Ala Ala Ser Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Met Phe  
145 150 155  
Ala Gly Tyr Phe Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Asp Gly His Met Met  
165 170 175  
Pro Pro Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Gly  
180 185 190  
Ile Trp Val Asp Glu Asp Asp Val Gly Thr Tyr Thr Ile Lys Ser Ile  
195 200 205  
Asp Asp Pro Gln Thr Leu Asn Lys Thr Met Tyr Ile Arg Pro Pro Met  
210 215 220  
Asn Ile Leu Ser Gln Lys Glu Val Ile Gln Ile Trp Glu Arg Leu Ser  
225 230 235  
Glu Gln Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Ile Ser Ser Gln Asp Phe Leu Ala  
245 250 255  
Asp Met Lys Asp Lys Ser Tyr Glu Glu Lys Ile Val Arg Cys His Leu  
260 265 270  
Tyr Gln Ile Phe Phe Arg Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro  
275 280 285  
Asn Ala Ile Glu Ala Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Val Thr  
290 295 300  
Met Asp Ser Tyr Leu Glu Arg Tyr Val  
305 310

(2)配列番号63の情報:

(1)配列の特徴:

- (A)長さ:1151塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(1)配列の種類:Thujaplicata cDNA PLR-Tp2

- (iii)ハイボセティカル:NO
- (iv)アンチセンス:NO
- (ix)配列の特徴:
  - (A)特徴を表す記号:CDS
  - (B)存在位置:61..996

(xi)配列:配列番号63:

GATAGCAGC ATTCTTCAC CAAATGGTC GCCCTTAAA GGAATAGTTT GGAACGAG 60  
ATC GAA CAG AGT AGC AGC GTT TTG ATA GTG GGC ACA GGA TAC ATA  
Met Glu Glu Ser Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile  
315 320 325  
GGC AGA AGC ATT GTG AAA GCC AGC ATT GCT CTC GGC CAT COT ACT TTC  
Gly Arg Arg Ile Val Lys Ala Ser Ile Ala Leu Gly His Pro Thr Phe  
330 335 340 345  
ATT TTG TTT AGG AAA GAA GTT GTT TCT GAT GTA GAG AAA GTG GAG ATC  
Ile Leu Phe Arg Lys Glu Val Val Ser Asp Val Glu Lys Val Glu Met  
350 355 360  
TTA TTG TCC TTC AAA ARG AAT GGT GCC AAA TTA CTG GAG GCT TCA TTT  
Leu Leu Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Phe  
365 370 375  
GAT GAT CAC GAA AGC CTY GTA GAT GCT GTG ARG CAG GTT GAT GTT GTG  
Asp Asp His Glu Ser Leu Val Asp Ala Val Lys Glu Val Asp Val Val  
380 385 390 395  
ATA AGT GCA GTT CCA GCA CAC ATC CCG CAT CAC ATC CTT CAA CAG  
Ile Ser Ala Val Ala Gly Asn His Met Arg His His Ile Leu Gln Gln  
395 400 405  
CTC AAA TTA GTG GAG GCC ATT AAA GAA GCT GGA AAT ATT AAG AGG TTT  
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe  
410 415 420 425  
GTT CTT TCA GAA TTT GGG ATG GAT CCA GGG TTA ATG GAG CAT GCA ATG  
Val Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Gly Leu Met Glu His Ala Met  
430 435 440 445  
GCA CTT GGC AAC ATT GTA TTT ATT GAT AAA ATA AAA GTT CCA GAG GCC  
Ala Pro Gly Asn Ile Val Phe Ile Asp Lys Ile Lys Val Arg Glu Ala  
445 450 455  
ATA GAA GCT GCA TCC ATT CTT CAC ACT TAT ATC TCT GGC AAC ATR TTT  
Ile Glu Ala Ala Ser Ile Pro His Thr Tyr Ile Ser Ala Asn Ile Phe  
460 465 470 475  
GCT GGC TAC TTG GTT GGT GGA TTA GCT CAA CTT GGT GTG ATG COT  
Ala Gly Tyr Leu Val Gly Leu Ala Gln Leu Glu Arg Val Met Pro  
475 480 485 490  
CCT TCA GAA AAA GTA ATT CTC TAT GCA GAT GCA AAT GTC AAA GCT GTT  
Pro Ser Gln Lys Val Ile Leu Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Ala Val  
490 500 505



(2)配列番号65の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:1308塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状
- (ii)配列の種類:Thuja plicata cDNA PLR-1p3
- (iii)ハイボセディカル: NO
- (iv)アンチセンス: NO
- (ix)配列の特徴:
  - (A)特徴を表す記号: CDS
  - (B)存在位置: 164..1105

(xi)配列: 配列番号65:

AAAAACTCTT AGACCTATTT TCAATTTTAC CCAATTCATA AGCTTTTGT GGGTCTCTTC 60  
 AAAAAAGCC CCTCTCTGTT AGAGGCAAG ANCGCATGTC TCGATATAT GTAGAGGCA 120  
 AAAAAAGCA AATTTGACTG TCGAATGTA TGCACATAG AAT ATG GAT AAG AAG 175  
 Met Asp Lys Lys  
 315  
 AGC AGA GTT CTA ATA GTG GGG GGT ACT GGT TTT ATA GGC AAA AGA ATT 223  
 Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Lys Arg Ile  
 320 330  
 GTG AAG GCC AGT TTG GCT CTT GGC CAT CCT ACT TAT GTT TTG TTC AAG 271  
 Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Tyr Val Leu Phe Arg  
 335 340 345  
 CCA GAA GCC CTC TGT TAC ATT GAC AAA GTG CAG ATG TTG ATA TTC TTC 319  
 Pro Glu Ala Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Val Gln Met Leu Ile Ser Phe  
 350 355  
 AAA CAG CTT GGG GCC AAA CTT CTT GAG GCT TCA TTG GAT GAC CAC GAA 367  
 Lys Gln Leu Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Leu Asp Asp His Gln  
 365 370 375  
 GGG CTT GTG GAT GTT GTG AAA CAA GTA GAT CTT GTC ATC AGT GCT GTT 415  
 Gly Leu Val Asp Val Val Lys Gln Val Asp Val Val Ile Ser Ala Val  
 385 390 395  
 TCA GGA GGT GTG GCG CAC CAT ATA CTT GAC CAC CTC AAG CTA GTG 463  
 Ser Gly Gly Leu Val Arg His His Ile Leu Asp Gln Leu Lys Leu Val  
 400 405  
 CAG GCA ATT AAA GAA GCT GGC AAT ATT AAG AGA TTT CTT CCT TCA GAA 511  
 Glu Ala Ile Lys Glu Ala Cys Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu  
 415 420 425

TTT GGG ATG GAC CCA GAT GTT GTA GAA GAT CCA TTG GAA CTT GCT AAC 559  
 Phe Gly Met Asp Pro Asp Val Val Glu Asp Pro Pro Gly Asn  
 430 435 440  
 ATT ACA TTC ATT GAT AAA AGA AAA GTT AGA CGT GCC ATT GAA GCA GCA 607  
 Ile Thr Phe Ile Asp Lys Arg Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala Ala  
 445 450 455  
 ACC ATT CCT TAC ACA TAT GTG TCT TCA AAT ATG TTT GCT GGG TTC TTT 655  
 Thr Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Met Phe Ala Gly Phe  
 460 465 470 475  
 GCT GGA AGC TTA GCA CAA CTG CAA GAT GCT CCG GCG ATG ATG CCG GCT 703  
 Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Asp Ala Pro Arg Met Met Pro Ala  
 480 485 490  
 CCA GAT AAA GTT CTG ATA TAT GGA GAT GGA AAT GTT AAA GCT GTT TAT 751  
 Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Gly Val Tyr  
 495 500 505  
 GTA GAT CAA GAT GAT GCT GCA ATA TGC ATA CTC AAA TCA ATT GAT GAT 799  
 Val Asp Glu Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Ile Val Lys Ser Ile Asp Asp  
 510 515 520  
 CCT GCG ACA CTC AAC AAG ACT GTG TAT ATC AGG CCA CCA ATG AAT ATA 847  
 Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Pro Met Asn Ile  
 530 535 540  
 CTT TCA CAG AAA GAA GTA GTT GAA ATA TGG GAG AGA CTA TCA GGT TTG 895  
 Leu Ser Gln Lys Lys Ile Tyr Val Val Glu Ile Trp Glu Arg Leu Ser Gly Leu  
 545 550 555  
 AGC CTA GAA AAA ATC TAC TCT TCG GAG GAC CAA CTT CTT AAT ATG AAA 943  
 Ser Leu Glu Ser Tyr Val Ser Glu Asp Gln Leu Leu Asn Met Lys  
 560 565 570  
 GAT AAA TCT TAT GTG GAG AAG ATG GCA CCA TGT CAT CTC TAT CAT TTT 991  
 Asp Lys Ser Tyr Val Glu Lys Met Ala Arg Cys His Leu Tyr His Phe  
 575 580 585  
 TTT ATC AAA GGG GAT CTT TAC AAT TTT GAA ATT GCA CCC AAT GCT ACT 1039  
 Phe Ile Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asn Ala Thr  
 590 595 600  
 GAA GGC ACA AAA CTT TAT CCA GAA GTC AAA TAC ACA ACC ATG GAT TCA 1087  
 Glu Gly Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Thr Met Asp Ser  
 605 610 615 620  
 TAT ATG GAG CTT TAT CTA TAGCTATAG ATTCTTCTTA AATATAGCT 1135  
 Tyr Met Glu Arg Tyr Leu  
 625  
 TCGAATATC TTAATCAT AGAGTGAT TCGATATTA TACACACAC TCGCTCTTT 1195  
 ATAGATATC TTTTATATG GTGGCTTTA TAAACATGT ATAAAAA TCGAATACA 1255  
 TATTTTAAA TTGCAATTA TAACCACTT TANTATAAA AAAAAAAA AAA 1308

## (2) 配列番号 6.6 の情報:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 314 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: タンパク質

## (xi) 配列: 配列番号 6.6:

Met Asp Lys Lys Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Phe Ile 1 10 15  
 Gly Lys Arg Ile Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Tyr 20 25 30  
 Val Leu Phe Arg Pro Glu Ala Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Val Gln Met 35 40 45  
 Leu Ile Ser Phe Lys Gln Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Leu 50 55 60  
 Asp Asp His Gln Gly Leu Val Asp Val Val Lys Gln Val Asp Val Val 65 70 75 80  
 Ile Ser Ala Val Ser Gly Gly Leu Val Arg His His Ile Leu Asp Glu 85 90 95  
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe 100 105 110  
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Asp Val Val Glu Asp Pro Leu 115 120 125  
 Glu Pro Gly Asn Ile Thr Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala 130 135 140  
 Ile Glu Ala Ala Thr Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Met Phe 145 150 155  
 Ala Gly Phe Phe Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Gln Asp Ala Pro Arg 160 165 170  
 Met Met Pro Ala Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val 175 180 185  
 Lys Gly Val Tyr Val Asp Glu Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Ile Val Lys 190 195 200  
 Ser Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro 205 210 215  
 Pro Met Asn Ile Leu Ser Gln Lys Glu Val Val Glu Ile Trp Glu Arg 220 225 230

Ileu Ser Gly Leu Ser Leu Glu Lys Ile Tyr Val Ser Glu Asp Gln Leu 245 250  
 Leu Asn Met Lys Asp Lys Ser Tyr Val Glu Lys Met Ala Arg Cys His 255 260  
 Leu Tyr His Phe Phe Ile Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly 265 270  
 Pro Asn Ala Thr Glu Gly Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr 275 280  
 Thr Met Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu 285 290  
 Thr Met Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu 295 300  
 Thr Met Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu 305 310

## (2) 配列番号 6.7 の情報:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1287 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Thuja plicata cDNA PIR-Tp4

(iii) ハイボセシカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 11..946

## (xi) 配列: 配列番号 6.7:

GAAGCAGAG ATG GAA GAG AGT AGC AGC ATT TTG GTA GTG GGA GGC ACA 49  
 Met Glu Glu Ser Ser Arg Ile Leu Val Val Gly Gly Thr 315 320 325  
 GGA TAC ATA GGC ACA AGC ATT GTG AAA GCC AGC ATT GCT GTG GGC CAT 97  
 Gly Tyr Ile Gly Arg Arg Ile Val Lys Ala Ser Ile Ala Leu Gly His 330 335 340  
 CCT ACT TTC ATT TTG AGG AAA GAA GTT GTT TCT GAT GTA GAG AAA 145  
 Pro Thr Phe Ile Leu Phe Arg Lys Glu Val Val Ser Asp Val Glu Lys 345 350 355

GTG GAG ATG TTA TTC TCC AAA AGC GAT GGT GCG AAA TTA CTG GAG 193  
Val Glu Met Leu Leu Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Lys Leu Leu Glu 375  
360  
GCT TCA TTT GAT GAT GAG AGC GTT GTA GAT GCT CTG AGC GAG GTT 241  
Ala Ser Phe Asp Asp His Glu Ser Leu 385  
390  
GAT GTT GTC ATA GAT GCA GTT GCA GGA GAC CAC ATG CCG CAT CAC ATC 289  
Asp Val Val Ile Ser Ala Val Ala Gly Asn His Met Arg His Ile 405  
400  
CTT GAA CAG CTC AAA TTA GTG GAG GCC ATT AAA GAA GCT GGA AAT ATT 337  
Leu Glu Glu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile 420  
410  
AAG AGG TTT GTC CCT TCA GAA TTT GCG ATG GAT CCA GCG TTA ATC GAC 385  
Lys Arg Phe Val Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp 435  
430  
CAT GCA ATG GCA CCA GGA GAC ATT GTA TTT ATT GAT AAA ATA AAA GTT 433  
His Ala Met Ala Pro Gly Asn Ile Val Phe Ile Asp Lys Ile Lys Val 455  
440  
CGA GAG GCC ATT GAA GCT GCA GCT ATT GCT CAC ACT TAT ATT TCT GCC 461  
Arg Glu Ala Ile Glu Ala Ala Ala Ile Pro His Thr Tyr Ile Ser Ala 470  
460  
AAT ATA TTT GCT GCG TAC TTG GTT GGT GGA TTA GCT CAA CTT GGT GGT 529  
Asn Ile Phe Ala Gly Tyr Leu Val Gly Gly Leu Ala Glu 485  
475  
GTG ATG GCT TTT TCA GAC AAA GTA TTT CTC TAT GGA GAT GGA ATC GTC. 577  
Val Met Pro Pro Ser Asp Lys Val Phe Leu Tyr Gly Asp Gly Asn Val 500  
490  
AAA GCT GTT TGG ATA GAT GAA GAA GAT GTT GGA ATA TAC ACA ATC AAA 625  
Lys Ala Val Trp Ile Asp Glu Glu Asp Val Gly Ile Tyr Thr Ile Lys 515  
505  
GCA ATT GAT GAC CCT CCG ACC CTA AAT MAG ACT GTG TAC ATC AGC CCA 673  
Ala Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro 535  
520  
CCT TTG AAT GTT TTT TCC CAG MAG GAA GTG GTT GAA AAA TGG GAA AAA 721  
Pro Leu Asn Val 540  
545  
TTA TCA ACA MAG ACC TTG GAT AAA ATA TAT ATG TCT GTT GAG GAT TTT 769  
Leu Ser Arg Lys Ser Leu Asp Lys Ile Tyr Met Ser Val Glu Asp Phe 565  
555  
CTC GCA GGC ATG GAA GGT CAA TAT GGA GAG MAG ATT GGA ATA TCA 817  
Leu Ala Gly Met Glu Gly Glu Ser Tyr Gly Glu Lys Ile Gly Ile Ser 580  
575  
GAT TTC TAT CAG ATG TTC TAT AAG GGG GAT CTT TAT AAT TTT CAA ATT 865  
His Phe Tyr Glu Met Phe Tyr Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile 595  
585  
GGA CCT AAT GGA GTA GAA GCT TCC CAA CTT TAC CCA GGA GTR AAA TAC 913  
Gly Pro Asn Gly Val Glu Ala Ser Glu Leu 605  
610

ACA ACA GTG GAC TCA TAC ATG GAG CCG TAC CTA TGAATCTT CTTCTGAGAG 966  
Thr Thr Val Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu 620  
625  
AATATTAAAT TCAATTAAAT GCTTTCTAAA AGTTTATAA TTTTGACATA ATGCTAAATA 1026  
TAGACTGACA GTATCTAGAT AATAATATTC AATATGATAT ATTACAGAT CAGTTGAGAT 1086  
GACTTTTCC CTTTAATCTGC ATGCTCAACA TATTTATAC AATCAAGCTA ATGCTTTTA 1146  
AGGTTGAGAA ACTAATATATC GTTTCTTAT ACATGGAAGA ACCAATTTT GATATTTGAG 1206  
ATTGTAATTA TTTTGATATGT TATGATTTTG ATAAATTTTC AAATGATTA TGAATCTCT 1266  
TTTAAATAAAA AAAAAAAAAA A 1287

(2) 配列番号68の情報:

(1) 配列の特徴:

(A)長さ:312アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(C)トポロジー:直鎖状

(11)配列の種類:タンパク質

(x1)配列:配列番号68:

Met Glu Glu Ser Ser Arg Ile Leu Val Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile 1  
15  
Gly Arg Arg Ile Val Lys Ala Ser Ile Ala Leu Gly His Pro Thr Phe 20  
30  
Ile Leu Phe Arg Lys Glu Val Val Ser Asp Val Glu Lys Val Glu Met 35  
40  
Leu Leu Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Phe 50  
55  
Asp Asp His Glu Ser Leu Val Asp Ala Val Lys Glu Val Asp Val Val 65  
70  
Ile Ser Ala Val Ala Gly Asn His Met Arg His His Ile Leu Glu Cln 85  
90  
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe 100  
105  
Val Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Gly Leu Met Asp His Ala Met 115  
120  
Ala Pro Gly Asn Ile Val Phe Ile Asp Lys Ile Lys Val Arg Glu Ala 130  
135  
Ile Glu Ala Ala Ile Pro His Thr Tyr Ile Ser Ala Asn Ile Phe 145  
150  
155  
160

Ala Gly Tyr Leu Val Gly Gly Leu Ala Gln Leu Gly Arg Val Met Pro  
165 170 175  
Pro Ser Asp Lys Val Phe Leu Tyr Gly Asp Gly Arg Val Lys Ala Val  
180 185  
Tyr Ile Asp Glu Glu Asp Val Gly Ile Tyr Thr Ile Lys Ala Ile Asp  
190 200 205  
Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Asn  
210 215 220  
Val Leu Ser Gln Lys Glu Val Val Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Ser Arg  
225 230 235 240  
Lys Ser Leu Asp Lys Ile Tyr Met Ser Val Glu Asp Phe Leu Ala Gly  
245 250 255  
Met Glu Gly Gln Ser Tyr Gly Glu Lys Ile Gly Ile Ser His Phe Tyr  
260 265 270  
Gln Met Phe Tyr Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asn  
275 280 285  
Gly Val Glu Ala Ser Gln Leu Tyr Pro Gly Val Lys Tyr Thr Val  
290 295 300  
Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu  
305 310

(B) 存在位置 : 2..922

(xi) 配列 : 配列番号 69 :

C Arg Gtt Cta Ata Gtg Ggt Ggc Aca Gca Tgc Ata Ggt Gca Aaa Ttt  
315 320 325  
Gta Aaa Gct Ggc Tta Gct Cta Ggc Cac Cca Aca Ttc Gtt Ttg Tcc Acs  
330 335 340  
Cca Gta Gga Ggt Ttt Gac Att Gac Gac Gac Cgc Cgc Cgc Cgc Ttc  
345 350 355  
Aaa Caa Gcg Ggt Ggc Aca Ctt Ttg Gac Ggt Tca Ttt Gac Gat Ttc Caa  
360 365 370  
Acc Ctt Gtc Gca Ggc Ttg Aac Cag Gtt Gat Gtt Gtg Aca Gct Gca Gtg  
375 380 385  
Gca Gga Aac Caa Ttc Aca Aac Ctt Ata Ctt Caa Cag Ctt Aaa Ttg Gtg  
390 395  
Gaa Gcc Ata Aaa Gaa Gct Ggc Aac Att Aac Aaa Ttt Ctt Tct Gaa  
400 405  
Ttt Gca Atc Gaa Cca Caa Ctc Atc Gac Cac Gct Ttg Gaa Cct Ggt Aac  
410 415  
Gct Gtc Ttc Att Gat Aac Aac Ggt Ggc Ggc Ggc Att Gaa Gca Gca  
420 425  
Ggc Att Cgt Tac Aca Gtt Gtc Tct Tca Aat Ata Ttt Gct Ggg Ttt Tta  
430 435  
Gca Gga Ggg Ttg Gca Caa Att Ggc Ggc Ctt Atg Cct Cct Ggt Gaa  
440 445  
Gta Gtt Atc Tgt Ggt Gac Ggt Aac Gtt Aaa Gct Gtt Tgg Gtc Gac Gaa  
450 455  
Gat Gtt Gtc Gga Ata Tgc Aca Ctg Aaa Aca Aac Gac Gac Cgc Act  
460 465  
Ctg Aac Aac Act Gta Tgt Atc Aac Cca Ctc Aaa Aat Att Ctc Tct Cag  
470 475  
Arg Gac Ctt Ctg Gca Aac Tgg Gaa Aaa Ctc Tca Gaa Aac Tgt Ttg Aac  
480 485  
Lys Glu Leu Val Ala Lys Trp Glu Lys Ser Gly Lys Cys Lys Lys  
490 495  
500 505  
510 515  
520 525  
530 535  
540 545  
550 555

(2) 配列番号 69 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1282塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 種の数 : 一本鎖

(ii) トポロジ : 直鎖状

(iii) 配列の種類 : Tsuga heterophylla cDNA PLR-Thl

(iv) ハイボセティカル : NO

(v) アンチセンス : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CDS

AAA ACA TAC ATT TCT CCG GAT TTT CTT GCA GCG ATC GAA GAT GAA  
Lys Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu Ala Gly Ile Glu Asp Gln  
335 360 365

CCT TAC GAA GAT CAG CTC GGA ATA TCT CAC TTC TAT CAA ATC TTT TAC  
Pro Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His Phe Tyr Gln Met Phe Tyr  
370 375 380 385

AGT GGA GAT CTC TAT ANT TTT GAG NTT GGG CCA GAC GGT AGA GAA GCA  
Ser Gly Asp Leu Tyr Asp Phe Glu Ile Gly Pro 390 395

ACA GTG CTA TAC CTT GAA GTT GAA TAC ACT ACC ATG GAT TCT TAT TTG  
Thr Val Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr Thr Met Asp Ser Tyr Leu  
400 405 410 415 420

DAG CGC TAC TTA TACGAGCAT GAGGTTTAT GTTCTACGAC ATGAGTCCCA  
Lys Arg Tyr Leu

CGAGAAATAC CAGAAATCTT CATTGAGAT CAAATATGCG ATAAATATTT CAGCTATAGT  
1022

TCCATCAGAA ATACAGAAA ITTCTATGCG AGTTCAGATA ATGGATATAT ATATCTATAT  
1082

TTAGTTTTHA TTTATCGAAA TAGGCTGCGA CGAATGATAT ATATATCAT CTGATATGGA  
1142

CGGCAAGGTT GTAAATGCG AAGCTGTACA GTATATACGT CTGTGCGCGA AAGATCTCTA  
1202

TATCATATTA ACTGATGCGA AAGGTATACA TTTGCTATTA ACTATGCTTG AATTTTATTT  
1262

TCGAAATTA AAAAAAAAAA  
1282

(2) 配列番号 70 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 307 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 70:

Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile Gly Arg Lys Phe Val  
1 5 10 15

Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Phe Val Leu Ser Arg Pro  
20 25 30

Glu Val Gly Phe Asp Ile Glu Lys Val His Met Leu Leu Ser Phe Lys  
35 40 45

Gln Ala Gly Ala Arg Leu Leu Glu Gly Ser Phe Glu Asp Phe Gln Ser  
50 55 60

Leu Val Ala Ala Leu Lys Gln Val Asp Val Ile Ser Ala Val Ala  
65 70 75 80

Gly Asn His Phe Arg Asn Leu Ile Leu Gln Gln Leu Lys Leu Val Glu  
85 90 95

Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe  
100 105 110

Gly Met Glu Pro Asp Leu Met Glu His Ala Leu Glu Pro Gly Asn Ala  
115 120 125

Val Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala Ala Gly  
130 135 140 145

Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Ile Phe Ala Gly Tyr Leu Ala  
150 155 160 165

Gly Gly Leu Ala Gln Ile Gly Arg Leu Met Pro Pro Arg Asp Glu Val  
170 175 180

Val Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Ala Val Trp Val Asp Glu Asp  
185 190

Asp Val Gly Ile Tyr Thr Leu Lys Thr Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu  
195 200 205

Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Lys Asn Ile Leu Ser Gln Lys  
210 215 220

Glu Leu Val Ala Lys Trp Glu Lys Leu Ser Gly Lys Cys Leu Lys Lys  
225 230 235 240

Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu Ala Gly Ile Glu Asp Gln Pro  
245 250 255

Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His Phe Tyr Gln Met Phe Tyr Ser  
260 265 270

Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asp Gly Arg Glu Ala Thr  
275 280 285

Val Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr Thr Met Asp Ser Tyr Leu Lys  
290 295 300

Arg Tyr Leu  
305

(2) 配列番号71の情報は:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1328塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Tsuga heterophylla cDNA PLR-Th2

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ii) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 20..946

(ii) 配列: 配列番号71:

GAATTCGGCA CAGCTAC AGC AGC AGC CTT CTA ATA GTG GGT GGC ACA GGA 52  
Met Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gln  
310 313  
TAC ATA GGT AGA AAA TTT GTA AAA GCT AGC TTA GGT CTA GGC CAC CCA 100  
Tyr Ile Gly Arg Lys Phe Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro  
320 323  
ACA TTC GTT TTC TCC AGC CCA GAA GTA GGT TTT CAC ATT GAG AAC GTG 148  
His Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Val Gly Phe Asp Ile Glu Lys Val  
335 345  
CAC ATG TTG CTC TCC TTC AAA CAA GCG GGT GGC AGA CTT TTG GAG GGT 196  
His Met Leu Leu Ser Phe Lys Glu Ala Gly Ala Arg Leu Leu Glu Gly  
355 365  
TCA TTT GAG GAT TTC CAA AGC CTT GTG CCA GGC TTC AGC CAG CTT GAT 244  
Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ser Leu Val Ala Ala Leu Lys Glu Val Asp  
370 375  
GTT GTG ATA ACT GCA GTG CCA GCA AGC CAT TTC AGA AAC CTT ATA CTT 292  
Val Val Ile Ser Ala Val Ala Glu Val Leu Val Phe Arg Asn Leu Ile Leu  
385 395  
CAA GAG CTT AAA TTG GTG GAA GGC ATA AAA GAG GGT CCG AAC ATT AAG 340  
Gln Glu Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Arg Asn Ile Lys  
400 410  
AGA TTT CTT CTT TCT GAA TTT GCA ATG GAC CCA GAC CTC ATG GAG CAC 388  
Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Eco Asp Leu Met Glu His  
415 425  
GCT TTG GAA CCG GGT AAC GCT GTC TTC ATT GAT AAG AGA AAG CTT CGG 436  
Ala Leu Glu Pro Gly Asn Ala Val Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg  
435 445  
CGG GCG ATT GAA GCA GGC ATT CTT TAC AGC TAT GTC TCT TCA AAT 484  
Arg Ala Ile Glu Ala Ala Gly Ile Cys Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn  
450 455

ATA TTT CTT GCG TAT TTA GCA GGA GCG TTG GCA CAA ATT GGC CGG CTT 532  
Ile Phe Ala Gly Tyr Leu Ala Gly Gly Leu Ala Gln Ile Gly Arg Leu  
465 470 475  
ATG CTT CTT CTT GAT GAA GTA GTT ATC TAT GGA GAT GGT AAC GTT AAA 580  
Met Pro Pro Arg Asp Glu Val Val Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys  
480 485 490  
GCT GTT TGG GTG GAC GAA GAT GAT GTC GGA ATA TAC ACA CTG ACA ACA 628  
Ala Val Trp Val Asp Asp Asp Val Gly Ile Tyr Thr Leu Lys Thr  
495 500 505  
ATC GAT GAT CCA GCG ACT CTG AAC AAG ACT GTA TAT ATC AGG CCA CTC 676  
Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu  
515 520 525  
AAA AAT ATA CTC TCT CAG AAG GAG CTT GTG CCA AAG TGG GAA AAA CTC 724  
Lys Asn Ile Leu Ser Gln Lys Glu Leu Val Ala Lys Trp Trp Lys Leu  
530 535 540  
TCA GCA AAG TTT TTG AAG AAA ACA TAC ATT TCT GCT GAG GAT TTT CTT 772  
Ser Gly Lys Phe Leu Lys Lys Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu  
545 550 555  
GCA GCG ATC CAA GAT CAA CTT TAC CAA CMT CAG GTC GCA ATA TCT CAC 820  
Ala Gly Ile Glu Asp Gln Pro Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His  
560 565 570  
TTC TAT CAA ATG TTT TAC AGT GCA GAT CTC TAT AAT TTT GAG ATT GGG 868  
Phe Tyr Gln Met Phe Tyr Ser Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly  
575 580 585  
CCA GRC GGT AGA GAA GCA ACA ATG CTA TAC CTT GAA GTT CAA TAC ACT 916  
Pro Asp Gly Arg GAA Ala Thr Met Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr  
595 600 605  
ACC ATG GAT TCT TAT TTG AAG CCG TAC TTA TACAGGAT GAGGTATAT 966  
Thr Met Asp Ser Tyr Leu Lys Arg Tyr Leu  
610 615  
GTTCTGAGC ATGAATCCA CAGAAATAC CAGAAATCTT CATTCAAGT CAAATATGG 1026  
ATAATATAT CACATATGT TCGATCGAA ATATCGAAA TTCTATCA AGTTCAATA 1086  
ATGATATAAT AATTCAATAT TTAAGTTTAA TTAGGCTGGA CCAAGCTTT 1146  
AATCAGTAT CAAATATAT TCATCTGATA TGGACGGCA GCTTGTAATA TTGACGGCG 1206  
TACAGTAACT AGCTTTGTC GCGAAGCT ACCAATCGA TAACTATG TCTGTGCGG 1266  
TAAAGTACC AATATCGATAT AACTGATGT ACCAATTCGT AATCACTATG CTGTGCGAGG 1326  
AA 1328

(2) 配列番号72の情報は:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 309アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質



## (xi) 配列：配列番号72：

Met Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile Gly Arg Lys  
1 5 10 15  
Phe Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Phe Val Leu Ser  
20 25 30  
Arg Pro Glu Val Gly Phe Asp Ile Glu Lys Val His Met Leu Leu Ser  
35 40 45  
Phe Lys Gln Ala Gly Ala Arg Leu Leu Glu Gly Ser Phe Glu Asp Phe  
50 55 60  
Gln Ser Leu Val Ala Ala Leu Lys Gln Val Asp Val Val Ile Ser Ala  
65 70 75 80  
Val Ala Gly Asn His Phe Arg Asn Leu Ile Leu Gln Gln Lys Leu  
85 90 95  
Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Arg Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser  
100 105 110  
Glu Phe Gly Met Asp Pro Asp Leu Met Glu His Ala Leu Glu Pro Gly  
115 120 125  
Asn Ala Val Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala  
130 135 140  
Ala Gly Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Ile Phe Ala Gly Tyr  
145 150 155 160  
Leu Ala Gly Gly Leu Ala Gln Ile Gly Arg Leu Met Pro Pro Arg Asp  
165 170 175  
Glu Val Val Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Ala Val Trp Val Asp  
180 185 190  
Glu Asp Asp Val Gly Ile Tyr Thr Leu Lys Thr Ile Asp Asp Pro Arg  
195 200 205  
Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Lys Asn Ile Leu Ser  
210 215 220  
Gln Lys Glu Leu Val Ala Lys Trp Glu Lys Leu Ser Gly Lys Phe Leu  
225 230 235  
Lys Lys Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu Ala Gly Ile Glu Asp  
240 245 250 255  
Gln Pro Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His Phe Tyr Gln Met Phe  
260 265 270  
Tyr Ser Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asp Gly Arg Glu  
275 280 285

Ala Thr Met Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr Thr Met Asp Ser Tyr  
290 295 300

Leu Lys Arg Tyr Leu  
305

## (2) 配列番号73の情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：358塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジ：直鎖状

(ii) 配列の種類：Forsythia intermedia指標タンパク質cDNAクローンを単離する  
るために使用されるcDNAプローブ

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

## (xi) 配列：配列番号73：

AAGGAGTGG TGTCTACTT CCACGACATA CTITTCANAG GGGATATTA CACGATGCC 60  
ACTGCGACCA TAGTCGGGTG CCCCCAATGG GGCACACAGA CTGCATGGC GGTCCCATTC 120  
AATTTTGGTG ACCTAATGGT GTTCGACGAT CCCTTACTT TACACACAGA TCTCCATCCA 180  
CCCCCATGG GTCCGGCACA AGGGAATGTAC TTCTATGATC AAAAAATGAC ATACATGCT 240  
TGGCTGGGT TCTCATTTT GTTCAATTC ACTAATATG TTGGACCTT GAACTTGGT 300  
GGGGCTGATC CATTTGTGAA CAAAGACTAGG GAGTATCAG TCATTTGGTG AACCA 355

## (2) 配列番号74の情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジ：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマーR20」

(iii) ハイボセティカル：NO

【図1】

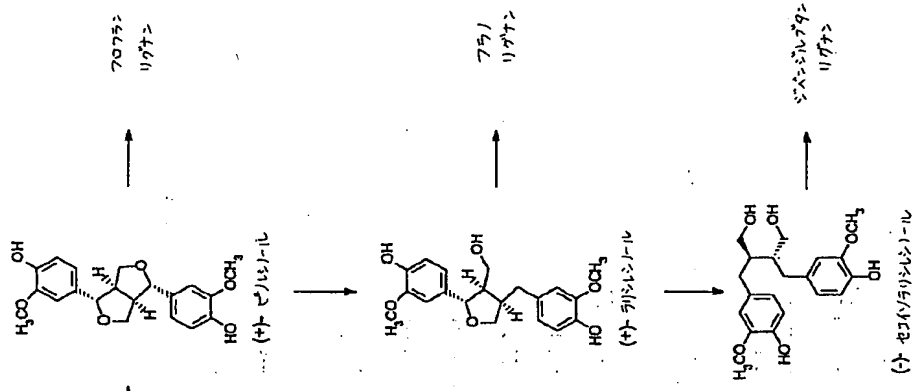


Fig. 1

(xi) 配列：配列番号74：

CAGCATGAC CATGATGCG

(2) 配列番号75の情報：

- (i) 配列の特徴：
  - (A) 長さ：19塩基対
  - (B) 型：核酸
  - (C) 鎖の数：一本鎖
  - (D) トポロジ：直鎖状
- (ii) 配列の種類：他の核酸
  - (A) 記載：[PCRプライマー-U19]
  - (ii) ハイボセディカル：NO

(xi) 配列：配列番号75：

GTGTTCCAG TCACGAGGT

(2) 配列番号76の情報：

- (i) 配列の特徴：
  - (A) 長さ：6アミノ酸
  - (B) 型：アミノ酸
  - (C) 鎖の数：関連なし
  - (D) トポロジ：関連なし
- (ii) 配列の種類：ペプチド (NADPH) 結合モチーフ
  - (ii) ハイボセディカル：NO
  - (v) フラグメント型：内部

(xi) 配列：配列番号76：

Gly Xaa Gly Xaa Gly

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US97/2091
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12N 9/02, 15/43, 15/79 US CL. : 435/189, 323.3, 321, 419, 320.1; 316/23.2, 23.6; 316/29.79 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/189, 323.3, 321, 419, 320.1; 316/23.2, 23.6; 316/29.79 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) A15. DIALOG search terms: pinorexinol/interictal reticulate, divergent pinodes, Forsythia intermedia, Thujic pinens, Thujic heterophylla		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to claim No.
X	CHU et al. Stereospecificity of (+)-pinorexinol and (+)-pinorexinol/reticulates from <i>Forsythia intermedia</i> . The Journal of Biological Chemistry, 25 December 1993, Vol. 268, pages 27026-27033, see entire document.	1, 10-12
A	KATAYAMA et al. An extraordinary accumulation of (-)-pinorexinol in cell-free extracts of <i>Forsythia intermedia</i> : Evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinorexinol. Phytochemistry, 1992, Vol. 31, No. 11, pages 3875-3881, see entire document.	1-58
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family name.		
* Special categories of cited documents: "1" Document defining the prior art of the invention (as far as it is known to the applicant) "2" Document of particular relevance, the cited document being a non-patent literature document "3" Document which may have been cited in the international filing date of the invention (as far as it is known to the applicant) "4" Document referred to in the abstract, but not cited in the text "5" Document published prior to the international filing date but later than the priority date thereof "6" Document published in a foreign language (that the applicant has not translated)		
Date of the actual completion of the international search 28 JANUARY 1998		Date of mailing of the international search report 23 FEB 1998
Name and mailing address of the ISA/US Box PCT Washington, D.C. 20541 Facsimile No. (703) 305-3330		Authorized officer KEITH D. HENDRICKS Telephone No. (703) 309-4196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup> 横断記号  
C12N 9/02 F1  
C12N 5/00 A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L, U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S, D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, F, I, GB, GE, GR, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, M, X, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 デイビッド・ローレンス・ピー  
アメリカ合衆国 ワシントン 99163, プ  
ルマン, エス. イー. アバー ドライヴ  
1710

(72)発明者 ディン・コバー・ゴストバ, アルベナ ティ  
アメリカ合衆国 メリーランド 21210,  
ボルチモア, ダブリュ. エニバーシテイ  
パークウェイ 116, プロードビュー  
アパートメント ナンバー1025

(72)発明者 藤田 政之  
アメリカ合衆国 ワシントン 99163, プ  
ルマン, エス. ダブリュ. アンソニー  
ナンバー3 215

(72)発明者 ガン, デイビッド アール.  
アメリカ合衆国 ワシントン 99163, プ  
ルマン, ビー-4, エス. イー. クレムガ  
ード アベニュー 921

(72)発明者 サルカネン, シモ  
アメリカ合衆国 ミネソタ 55406, ミネ  
アポリス, 39アイーエイチ アベニュー  
エス. 4051

【要約の続き】  
ノレシノール/ラリシノールレダクターゼの組換え  
発現のための系および方法が提供される。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**